



ORIGINAL

Análisis de la influencia de polimorfismos en *APOE*, *APOA5*, *LPL*, *LIPC* y *CETP* sobre los niveles de triglicéridos en población laboral malagueña

María José Ariza^{a,*}, Ana María Hornos^a, Francisco Javier Barón^b,
Eva Calvo-Bonacho^c, José Rioja^a, Pedro Valdivielso^{a,d},
Juan Carlos Sainz-Gutierrez^c, Montserrat Ruiz-Moraga^c, José Antonio Gelpi^c,
Pedro González-Santos^{a,c} y Miguel Ángel Sánchez-Chaparro^{a,c,d}

^a Departamento de Medicina y Dermatología, Facultad de Medicina, Laboratorio de Lípidos y Arteriosclerosis, Centro de Investigaciones Médico-Sanitarias (CIMES), Universidad de Málaga, Málaga, España

^b Departamento de Bioestadística, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga, España

^c Ibermutuamur Cardiovascular Risk Assessment (ICARIA) Study Group, Ibermutuamur: Mutua de Accidentes de Trabajo y Enfermedades Profesionales de la Seguridad Social n.º 274, Madrid, España

^d Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, España

Recibido el 25 de octubre de 2010; aceptado el 2 de febrero de 2011

Disponible en Internet el 2 de abril de 2011

PALABRAS CLAVE

Triglicéridos;
Variantes genéticas;
Interacciones
genética ambiente

Resumen

Introducción: Los triglicéridos se consideran un factor independiente de riesgo vascular. La influencia, por separado, de polimorfismos en genes como *APOE*, *APOA5*, *LPL*, *LIPC* y *CETP* sobre dichos niveles está descrita, por lo que resulta de interés su análisis conjunto y el estudio de interacciones con factores ambientales.

Métodos: Se han genotipado en 1.825 sujetos (80% varones, edad media 36 años) procedentes del estudio ICARIA, el polimorfismo de *APOE*, 2 variantes de *APOA5* (S19W y -1131 T/C), 5 de *LPL* (D9N, N291S, PvuII, HindIII y S447X), 1 de *LIPC* (-250G/A) y 1 de *CETP* (TaqIβ) mediante PCR-restricción y ensayos TaqMan. El efecto conjunto de las variantes se ha analizado mediante regresión lineal con la variable triglicéridos transformada logarítmicamente y corrigiendo por covariables. Las interacciones se han explorado mediante contrastes múltiples.

Resultados: El alelo ε4 de *APOE*, los polimorfismos de *APOA5* S19W y -1131T/C y las variantes de *LPL*, D9N y N291S mostraron un efecto elevador de triglicéridos significativo e independiente. Los polimorfismos HindIII y S447X de *LPL* se asociaron significativamente con una reducción de los niveles de TG. Las variantes PvuII (*LPL*), -250G/A (*LIPC*) y TaqIβ (*CETP*) no mostraron asociaciones significativas. Se encontró una tendencia estadística ($p=0,048$) para la interacción entre obesidad abdominal (perímetro de cintura >102 cm en hombres; >88 cm en mujeres) y el alelo *APOE*-ε4.

* Autora para correspondencia.

Correo electrónico: mariza@uma.es (M.J. Ariza).

KEYWORDS

Triglyceride levels;
Genetic variants;
Gene-environment
interactions

Conclusiones: Nuestro trabajo muestra la influencia del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* y de las variantes S19W y -1131T/C de *APOA5* y D9N, N291S, HindIII y S447X de *LPL* sobre los niveles de triglicéridos y sugiere un efecto modulador de la obesidad abdominal sobre el alelo $\epsilon 4$.

© 2010 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

Analysis of the influence of polymorphisms in the *APOE*, *APOA5*, *LPL*, *LIPC* and *CETP* genes on triglyceride levels in a working population in Malaga (Spain)**Abstract**

Introduction: Triglyceride levels are considered to be an independent vascular risk factor. The influence of polymorphisms in genes such as *APOE*, *APOA5*, *LPL*, *LIPC* and *CETP* on these levels has been separately described. The aim of the present study was to analyze the combined effects of these polymorphisms and their interaction with environmental factors.

Methods: We genotyped the *APOE* polymorphism, two variants of *APOA5* (S19W and -1131 T/C), five of *LPL* (D9N, N291S, PvuII, HindIII and S447X), one of *LIPC* (-250G/A) and one of *CETP* (TaqI β) by polymerase chain reaction-restriction and TaqMan assays in 1825 subjects (80% male, mean age 36 years) from the ICARIA study. The combined effect of the variants was analyzed by linear regression with the log-transformed triglyceride variable and adjustment for covariates. The interactions were explored by multiple comparisons.

Results: The $\epsilon 4$ allele of *APOE*, the *APOA5* polymorphisms S19W and -1131T/C and the *LPL* variants D9N and N291S independently and significantly increased triglyceride levels. The HindIII and S447X *LPL* polymorphisms were significantly associated with lower triglyceride levels. The PvuII (*LPL*), -250G/A (*LIPC*) and TaqI β (*CETP*) variants showed no significant associations. There was a statistical trend ($p=0.048$) for an interaction between abdominal obesity (waist circumference >102 cm in men and >88 cm in women) and the *APOE*- $\epsilon 4$ allele.

Conclusions: Our study shows the influence of the *APOE*- $\epsilon 4$ allele, the S19W and -1131T/C polymorphisms of *APOA5* and the *LPL*-D9N, N291S, HindIII and S447X variants on triglyceride levels and suggests that the effect of the $\epsilon 4$ allele could be modulated by interaction with abdominal obesity.

© 2010 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

La consideración de los cambios en los niveles de triglicéridos (TG) como un factor independiente de riesgo cardiovascular está avalada por diversos estudios^{1,2}. La triglicéridemia es un rasgo fenotípico complejo como refleja la gran variedad de partículas ricas en TG, principalmente quilomicrones, VLDL e IDL. Además, la hipertriglicéridemia (HTG) es una de las características que definen el síndrome metabólico³ y está presente en la dislipidemia genética más común, la hiperlipidemia familiar combinada.

Dentro del conjunto de factores responsables de la expresión fenotípica de la triglicéridemia y que, por tanto, pueden influir en el riesgo cardiovascular, es de interés el análisis de los factores genéticos y sus interacciones con factores ambientales, como posibles moduladores de su efecto⁴.

De entre los posibles genes candidatos implicados en el metabolismo de los TG y de las lipoproteínas, la influencia de los genes de *APOE*, *APOA5*, *LPL*, *LIPC* y *CETP* es clara. Estos genes codifican para enzimas y apolipoproteínas ampliamente citadas en la literatura por su relación con la expresión de la triglicéridemia, ya que juegan un papel esencial en la eliminación, transporte y remodelado de las lipoproteínas ricas en TG⁵⁻⁹.

La asociación entre los alelos comunes de *APOE* ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$), las enfermedades cardiovasculares y los cambios en los niveles de colesterol es de las más sólidas descritas en la

literatura; sin embargo, es más discutida su asociación con las variaciones en los niveles de TG¹⁰, que parece ser más dependiente del contexto ambiental¹¹.

Los polimorfismos más informativos del gen de *APOA5* son la variante de cambio de sentido S19W y la variante del promotor -1131T/C. Ambas están asociadas con un aumento en los niveles de TG en diversas poblaciones incluso con la presencia de HTG grave y de enfermedad cardiovascular¹²⁻¹⁴.

Entre las variantes del gen *LPL*, D9N y N291S se han asociado en distintos estudios con niveles elevados de TG y con enfermedad coronaria^{15,16}. Al contrario, los polimorfismos HindIII y S447X se han relacionado con perfiles más favorables¹⁷⁻¹⁹. El papel de la variante intrónica PvuII es más controvertido, ya que existen estudios en los que se asocia a cambios en los niveles de lípidos e incluso a una mayor prevalencia de enfermedad vascular²⁰, mientras que en otros no se pone de manifiesto ningún efecto²¹.

Los genes *LIPC* y *CETP* son dos buenos ejemplos de la importancia del contexto genético y ambiental en el que se analizan los polimorfismos. Las variantes más conocidas del gen *LIPC* son las del promotor, como por ejemplo -250G/A. Su estudio es interesante, pues aun estando asociadas con niveles más altos de colesterol HDL, también tienen relación con la enfermedad arterial periférica²². También la variante -514T/C —en desequilibrio de ligamiento con la anterior— se asocia con cambios en los niveles de TG en algunas poblaciones²³.

Finalmente, la variante TaqI β del gen *CETP* se ha estudiado en relación a los niveles de colesterol HDL, la interacción con factores ambientales, su relación con el síndrome metabólico y, con resultados controvertidos, su asociación con el riesgo cardiovascular⁹. Dada la estrecha relación entre el metabolismo de TG y C-HDL, su estudio puede resultar de interés en el marco de este trabajo.

En este contexto hemos determinado las frecuencias alélicas del polimorfismo de *APOE*, de dos variantes de *APOA5* (S19W y -1131 T/C), cinco variantes de *LPL* (D9N, N291S, Pvull, HindIII y S447X) una de *LIPC* (-250G/A) y otra de *CETP* (TaqI β), en una cohorte de población laboral malagueña, con el objetivo de analizar la asociación de estas variantes con los niveles séricos de TG y valorar si se producía alguna interacción entre estas variantes y los factores ambientales determinados en la población de estudio.

Métodos

Población de estudio

Este trabajo forma parte del proyecto ICARIA (Ibermutuamur Cardiovascular Risk Assessment)^{24,25}, que tiene como objetivo evaluar los factores de riesgo y el riesgo cardiovascular global en los trabajadores protegidos, con ocasión de los reconocimientos médicos anuales realizados en esta mutua de accidentes de trabajo. El presente estudio incluye 1.825 sujetos (1.460 varones y 365 mujeres) que acudieron a reconocimiento médico en la provincia de Málaga entre 2004 y 2005, y firmaron el consentimiento informado para participar en él. Se consideraron criterios de exclusión el encontrarse en situación de baja laboral o no otorgar el consentimiento para dicha participación. El estudio fue aprobado por el Comité Ético-Científico de Ibermutuamur y cumple las recomendaciones de Helsinki. Los datos recogidos han sido tratados confidencialmente, siguiendo la vigente Ley Orgánica de Protección de Datos española.

Todos los trabajadores cumplimentaron un cuestionario que incluía la edad, el género, la categoría profesional, la medicación, el consumo de tabaco y de alcohol, y antecedentes de diabetes, hipertensión, dislipidemia y enfermedad cardiovascular, de acuerdo a los criterios publicados previamente²⁵. El reconocimiento médico incluyó la determinación de peso, talla, perímetro abdominal y dos medidas de presión arterial en el mismo brazo con al menos 1 min de intervalo entre ambas, empleando un aparato semiautomático validado (Omron M41, Omron Electronics, Hoofddorp, Holanda). Las determinaciones bioquímicas se llevaron a cabo, en una muestra de suero obtenida tras 12 h de ayuno, en el laboratorio de referencia de Ibermutuamur, siguiendo protocolos estándar y los controles de calidad establecidos por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC).

Se consideró a los trabajadores como fumadores si fumaban al ser incluidos en el estudio o habían dejado de fumar menos de un año antes. En cuanto al consumo de alcohol, se distinguieron dos grupos: los que manifestaban consumir alcohol diariamente, de forma moderada, frente a los consumidores ocasionales y los no consumidores. La hipertensión se definió cuando había diagnóstico previo o tratamiento, o las presiones arteriales fueron $\geq 140/90$ mmHg. El perímetro

de cintura (PC) se consideró elevado a partir de 102 cm en hombres y 88 cm en mujeres³. Los valores del riesgo cardiovascular SCORE para países de bajo riesgo y el riesgo relativo se generaron automáticamente^{24,26}. Se consideró la presencia de HTG si los niveles séricos de TG en ayunas eran ≥ 150 mg/dl³.

Análisis genéticos

El ADN genómico se obtuvo utilizando un BioRobot[®] EZ1 (QIAGEN, Hilden, Alemania) a partir de sangre congelada extraída en EDTA. Todas las reacciones de PCR empleadas en el genotipado se llevaron a cabo en un iCycler iQ[™] (BioRad, California, EE.UU.) con las mezclas de reacción iQ[™] SYBR Green Supermix (análisis por restricción) o iQ[™] Supermix (análisis con sondas fluorescentes). Los polimorfismos de *APOE* (rs429358, rs7412), HindIII de *LPL* (rs320) y TaqI β de *CETP* (rs708272) se determinaron mediante amplificación por PCR y el análisis de los fragmentos de restricción. Los productos de amplificación fueron digeridos, respectivamente, con los enzimas de restricción HhaI, HindIII y TaqI siguiendo las instrucciones del fabricante (Takara, Japón). Los fragmentos resultantes fueron separados en geles con distintos porcentajes de agarosa o acrilamida según el tamaño de los fragmentos resultantes.

Los polimorfismos de *LPL*: Pvull (rs285), D9N (rs1801177), N291S (rs268) y S447X (rs328), la variante de *LIPC* -250G/A (rs2070895) y las de *APOA5*: S19W (rs3135506) y -1131T/C (rs662799) se genotiparon empleando sondas lineales fluorogénicas y el modo de discriminación alélica de la aplicación informática del termociclador iQ[™].

Para controlar la calidad del genotipado se emplearon muestras de genotipo conocido, se repitió el análisis en las muestras que presentaron un patrón de bandas ambiguo (variantes por PCR y restricción) y aquellas con datos ópticos aberrantes (ensayos con sondas). Además, se duplicaron los genotipos del 10% de las muestras seleccionadas al azar. La tasa de error de genotipado fue menor del 1%.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas SPSS (versión 14.0 para Windows) y R²⁷. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. La prueba de χ^2 se utilizó para verificar el equilibrio Hardy-Weinberg y para comparar frecuencias alélicas. Cuando los valores esperados en más del 20% de las casillas, en tablas de contingencia, fueron inferiores a 5 se aplicó el test de Fisher. El paquete SNPAssoc de R se empleó para las medidas de desequilibrio de ligamiento y para comprobar la validez de la clasificación de los sujetos de acuerdo a los modelos genéticos dominante (portadores: heterocigotos y homocigotos para los alelos menos frecuentes, frente a no portadores: homocigotos para el alelo más frecuente), codominante (homocigotos menos frecuentes o heterocigotos frente a homocigotos más frecuentes) o recesivo (homocigotos para el alelo menos frecuente frente a homocigotos más frecuentes y heterocigotos).

La variable TG se transformó logarítmicamente para mejorar la normalidad de la distribución. Los resultados se expresaron finalmente en la escala original, al deshacer

dicha transformación, como medias geométricas (MG) y los correspondientes intervalos de confianza (IC), asimétricos, al 95%. Las pruebas de ANOVA o t de Student se emplearon para comparar medias entre grupos para variables con una distribución normal. La prueba U de Mann-Whitney se aplicó para analizar diferencias entre grupos para variables ordinales.

Se elaboró un modelo de regresión lineal para contrastar la hipótesis nula de no asociación entre las variantes genéticas y el logaritmo de TG, ajustando por edad, género, perímetro de cintura, presión arterial, glucemia, consumo de tabaco y alcohol. A causa de la transformación logarítmica, los coeficientes «B» asociados al efecto de cada variante fueron multiplicativos. Las posibles interacciones entre las variantes genéticas y los factores no genéticos se evaluaron introduciendo en el modelo, uno por uno, los correspondientes factores de interacción de dos términos (variante X factor) ajustando para las covariables y aplicando, en el nivel de significación estadística, la corrección de Bonferroni para contrastes múltiples. Se emplearon métodos estándar de diagnóstico para asegurar la corrección de los modelos de regresión.

Resultados

Las principales características de la cohorte analizada se muestran en la [tabla 1](#). De forma similar a lo descrito en la población laboral a nivel nacional²⁵, la media de edad fue inferior a 40 años, los hombres fueron mayoría y el factor de riesgo más frecuente fue el consumo de tabaco. La prevalencia de HTG (TG \geq 150 mg/dl) fue del 22,8%. Sólo un hombre presentó niveles de TG superiores a 1.000 mg/dl.

Frecuencias alélicas

Todos los sujetos fueron genotipados para los polimorfismos relacionados en la [tabla 2](#). Nuestra población estuvo en equilibrio Hardy-Weinberg para todas las variantes analizadas. Entre los alelos de *APOE* fueron, respectivamente, de más a menos frecuente ϵ 3 (85%), ϵ 4 (10%) y ϵ 2 (6%). Los dos variantes de *APOA5* mostraron frecuencias alélicas similares (19W, 6,8%; -1131C, 6,2%). La frecuencia alélica más alta correspondió al alelo P- del polimorfismo Pvull de *LPL* (48%) y la más baja a los alelos 9N y 291S del mismo gen (1,6 y 1,5%). Los alelos TaqI β 2 (*CETP*); -250A (*LIPC*), H+ (*LPL*) y S447X (*LPL*) presentaron frecuencias intermedias (38, 24, 29 y 12%, respectivamente).

Por otra parte, se observó que los polimorfismos HindIII y S447X de *LPL* se encontraban en fuerte desequilibrio de ligamiento ($D' = 0,984$; $r^2 = 0,308$; $p < 0,00001$). Además, la variante Pvull de *LPL* se encontró asociada a varios polimorfismos del mismo gen: S447X ($D' = 0,943$; $r^2 = 0,125$); HindIII ($D' = 0,098$; $r^2 = 0,313$) y D9N ($D' = 0,798$; $r^2 = 0,011$), $p < 0,00001$, $p < 0,00001$ y $p < 0,001$, respectivamente.

Asociación entre las variantes genéticas y los niveles de triglicéridos

La [tabla 3](#) muestra las medias geométricas y los intervalos de confianza al 95% de los niveles de TG que presentan los genotipos de los polimorfismos analizados.

Tabla 1 Características demográficas, antropométricas, bioquímicas y clínicas de los sujetos de estudio (n = 1.825)

Edad (años) ^a	36 \pm 10
Género (hombres; mujeres) ^b	1.460 (80%); 365 (20%)
Índice de masa corporal (kg/m ²) ^a	27,0 \pm 5,0
Perímetro de cintura (cm) ^a	92,1 \pm 12,3
Presión sistólica (mmHg) ^a	126 \pm 17
Presión diastólica (mmHg) ^a	75 \pm 12
Glucemia (mg/dl) ^a	88 \pm 21
Colesterol total (mg/dl) ^a	200 \pm 41
Colesterol LDL (mg/dl) ^a	126 \pm 34
Colesterol HDL (mg/dl) ^a	50 \pm 12
Colesterol no HDL (mg/dl) ^a	150 \pm 39
Triglicéridos (mg/dl) ^c	99 (97-102)
Fumadores ^b	889 (49%)
Consumo de alcohol ^b	316 (18,2%)
Obesidad ^b	408 (22%)
Obesidad abdominal ^{b,d}	391 (21,9%)
Hipertensión ^{b,e}	374 (20,6%)
DM1 ^b	7 (0,4%)
DM2 ^b	22 (1,2%)
Enfermedad cardiovascular ^b	9 (0,56%)
Riesgo cardiovascular SCORE ^b	
Bajo	1,647 (94,2%)
Medio	15 (0,9%)
Alto	86 (4,9%)

^a Medias aritméticas \pm desviaciones típicas.

^b Número de individuos (porcentajes).

^c Media geométrica e intervalo de confianza al 95%.

^d Perímetro de cintura >102 cm en hombres; >88 cm en mujeres.

^e Diagnóstico previo o tratamiento o presión arterial elevada (sistólica o diastólica \geq 140/90 mmHg).

Colesterol LDL sólo para TG <400 mg/dl (n = 1.799).

Se observaron diferencias significativas entre los genotipos de *APOE*. Las variantes S19W y -1131T/C de *APOA5* y D9N de *LPL* se asociaron significativamente con concentraciones más altas de TG. Los portadores del polimorfismo N291S de *LPL* tuvieron niveles mayores de TG que los no portadores, si bien no se alcanzó la significación estadística. Al contrario, los polimorfismos S447X y HindIII de *LPL* mostraron un efecto reductor de los niveles de TG. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de TG de los genotipos de las variantes Pvull (*LPL*), -250G/A (*LIPC*) ni TaqI β (*CETP*), si bien los homocigotos B2B2 de este polimorfismo presentaron menores niveles que el resto ($p = 0,076$).

Antes de la elaboración del modelo de regresión lineal los sujetos se reclasificaron para analizar grupos de mayor tamaño y evitar situaciones de elevada colinealidad de acuerdo a lo siguiente.

En relación al polimorfismo de *APOE* se distinguió entre portadores (genotipos ϵ 4 ϵ 4, ϵ 3 ϵ 4, ϵ 2 ϵ 4) y no portadores (genotipos ϵ 3 ϵ 3, ϵ 2 ϵ 3, ϵ 2 ϵ 2) del alelo ϵ 4, los primeros con niveles más altos de TG (MG, 110 mg/dl; CI al 95%, 103-117) que los no portadores (MG, 98; IC al 95%, 94-100; $p = 0,001$). Para el alelo ϵ 2 los individuos se agruparon conforme a un modelo codominante: no portadores (ϵ 3 ϵ 4, ϵ 3 ϵ 3 y ϵ 4 ϵ 4; MG, 98; IC al 95%, 96-102); heterocigotos (ϵ 2 ϵ 3 y ϵ 2 ϵ 4; MG, 104; IC al 95%, 96-112) y homocigotos (ϵ 2 ϵ 2; MG, 55; IC al 95%,

Tabla 2 Distribución de genotipos (número de personas y porcentaje) y frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados

Gen	Variante	N.º secuencia	Distribución de genotipos		Frecuencias alélicas		p ^a
APOE	C112R R158C	rs429358 rs7412	ε2ε2	4 (0,22)	ε2	0,057	0,741
			ε2ε3	181 (9,92)	ε3	0,847	
	ε3ε3	1.312 (71,89)	ε4	0,096			
	ε3ε4	287 (15,73)					
	ε4ε4	22 (1,21)					
	ε2ε4	19 (1,04)					
APOA5	S19W	rs3135506	19SS	1.585 (86,85)	19S	0,932	0,982
			19SW	231 (12,66)	19W	0,068	
			19WW	9 (0,49)			
APOA5	-1131T/C	rs662799	-1131TT	1.609 (88,16)	-1131T	0,938	0,479
			-1131TC	206 (11,29)	-1131C	0,062	
			-1131CC	10 (0,55)			
LPL	D9N	rs1801177	9DD	1.768 (96,88)	9D	0,984	0,722
			9DN	56 (3,07)	9N	0,016	
			9NN	1 (0,05)			
LPL	N291S	rs268	291NN	1.771 (97,04)	291N	0,985	0,892
			291NS	54 (2,96)	291S	0,015	
			291SS	0 (0,00)			
LPL	Pvull	rs285	P+P+	483 (26,47)	P+	0,517	0,925
			P+P-	920 (50,41)	P-	0,483	
			P-P-	422 (23,12)			
LPL	Hind III	rs320	H+H+	920 (50,41)	H+	0,708	0,749
			H+H-	743 (40,71)	H-	0,292	
			H-H-	162 (8,88)			
LPL	S447X	rs328	447SS	1.431 (78,41)	447S	0,884	0,470
			447SX	364 (19,95)	447X	0,116	
			447XX	30 (1,64)			
LIPC	-250G/A	rs2070895	-250GG	1.071 (58,68)	-250G	0,765	0,960
			-250GA	651 (35,67)	-250A	0,235	
			-250AA	103 (5,64)			
CETP	Taq1β	rs708272	β1β1	689 (37,75)	β1	0,618	0,716
			β1β2	878 (48,11)	β2	0,382	
			β2β2	258 (14,14)			

^a Valor p del contraste para el equilibrio Hardy-Weinberg.

31-97); $p = 0,067$. No se obtuvieron diferencias significativas al comparar portadores y no portadores de $\epsilon 2$. Se descartó el modelo recesivo al incluir sólo 4 personas. En todos los casos se obtuvo el mismo resultado al excluir de los análisis los sujetos $\epsilon 2\epsilon 4$.

Para las variantes S19W y -1131T/C de APOA5 las personas se clasificaron como portadores o no portadores (grupo referencia) del alelo menos frecuente según un modelo dominante. En el caso de la variante D9N se realizó la misma agrupación al haber una sola persona con genotipo 9NN. En el caso del polimorfismo Taq1β, los sujetos se agruparon según el modelo recesivo.

Para los individuos portadores de las variantes de LPL S447X y HindIII, en desequilibrio de ligamiento y asociados con un efecto protector, se definieron tres grupos: homocigotos para los alelos más frecuentes de ambas variantes (ninguna variante protectora); portadores de HindIII o de S447X (una variante protectora), y portadores de HindIII y S447X (dos variantes protectoras). Los genotipos de cada grupo y los correspondientes niveles de TG se especifican en la tabla 4. Puede verse que el 99% de los sujetos con

una variante protectora fueron portadores del polimorfismo HindIII.

No se incluyeron en el modelo las variantes Pvull de LPL (colineal con otros polimorfismos del gen, sin diferencias en el análisis univariante) ni -250G/A de LIPC (sin diferencias en el análisis univariante).

Como se muestra en la tabla 5, tras ajustar por las covariables género, edad, perímetro de cintura, glucemia, presiones sistólica y diastólica, hábito de fumar e ingesta de alcohol, el modelo de regresión lineal mostró una asociación significativa del alelo $\epsilon 4$ de APOE y de los polimorfismos D9N y N291S de LPL, S19W y -1131T/C de APOA5 con un efecto elevador independiente y aditivo de los niveles de TG. Además, se confirma la asociación con una disminución de los niveles de TG de la combinación de variantes de LPL consideradas protectoras (HindIII/S447X).

Ninguno de los alelos no incluidos inicialmente del modelo (P-; Pvull-LPL; -250A; -250G/A-LIPC) alcanzó la significación al corregir individualmente por las covariables.

Puesto que no se encontraron pruebas de un efecto diferente de las variantes según el sexo (interacciones no

Tabla 3 Medias geométricas e intervalos de confianza al 95% de los niveles de triglicéridos (mg/dl) según los genotipos de las variantes analizadas

Gen	Variante	Genotipos	MG (IC 95%)	p ^a
<i>APOE</i>	C112R	ε2ε2	55 (31-97)	<0,001
		ε2ε3	105 (97-114)	
	R158C	ε3ε3	96 (93-99)	
		ε3ε4	108 (101-115)	
		ε4ε4	133 (104-170) ^b	
		ε2ε4	89 (71-112)	
<i>APOA5</i>	S19W	19SS	98 (95-101)	0,005
		19SW	105 (97-113)	
		19WW	170 (83-351) ^c	
<i>APOA5</i>	-1131T/C	-1131TT	98 (95-101)	0,012
		-1131TC	110 (102-118)	
		-1131CC	123 (87-173) ^d	
<i>LPL</i>	D9N	9DD	99 (96-101)	0,043
		9DN	111 (95-130)	
		9NN	315 -	
<i>LPL</i>	N291S	291NN	99 (96-102)	0,080
		291NS	113 (98-129)	
		291SS	-	
<i>LPL</i>	Pvull	P+P+	99 (94-104)	0,991
		P+P-	99 (96-103)	
		P-P-	99 (94-104)	
<i>LPL</i>	Hind III	H+H+	104 (100-108)	<0,001
		H+H-	95 (91-98) ^e	
		H-H-	92 (86-100) ^g	
<i>LPL</i>	S447X	447SS	102 (99-105)	<0,001
		447SX	90 (85-95) ^g	
		447XX	80 (66-97)	
<i>LIPC</i>	-250G/A	-250GG	99 (95-102)	0,930
		-250GA	100 (95-104)	
		-250AA	100 (90-112)	
<i>CETP</i>	Taq1β	β1β1	100 (95-104)	0,198
		β1β2	101 (97-105)	
		β2β2	93 (88-100)	

^aValor p de las pruebas ANOVA o t de Student con la variable transformada logarítmicamente.

Diferencias significativas (p<0,05) en el análisis post-hoc de Bonferroni.

^bcomparado con ε3ε3.

^ccomparado con 19SS y 19SW; incluye un hombre con TG>1.000 mg/dl.

^dcomparado con -1131TT.

^{e,f}comparado con H+H+.

^gcomparado con 447SS.

Tabla 4 Distribución de genotipos y niveles de triglicéridos según la presencia de los polimorfismos de *LPL* HindIII y/o S447X

Número de variantes protectoras	Genotipos	TG ^a
0 variantes protectoras (n = 916)	447SS/H+H+ (n = 916)	104 (100-108)
1 variante protectora (n = 519)	447SS/H+H- (n = 459)	98 (94-103)
	447SS/H-H- (n = 56)	
	447SX/H+H+ (n = 4)	
2 variantes protectoras (n = 390)	447SX/H+H- (n = 284)	89 (84-94) ^b
	447SX/H-H- (n = 76)	
	447XX/H-H- (n = 30)	

^a Medias geométricas (mg/dl) e intervalos de confianza al 95%. p < 0,0001 para la prueba de ANOVA.

^b Diferencias significativas en el análisis post hoc respecto de los grupos con una o ninguna variante protectora.

Tabla 5 Modelo de regresión lineal para la asociación entre las variantes y los niveles de triglicéridos corrigiendo por covariables

Variable	B (IC 95%) ^a	Beta ^b	Valor p
<i>APOε2^c</i>	1,024 (0,955-1,098)	0,014	5,1 10 ⁻¹
<i>APOε4^d</i>	1,105 (1,042-1,173)	0,068	3,7 10 ⁻⁴
<i>APOA5-S19W^d</i>	1,130 (1,057-1,208)	0,073	9,4 10 ⁻⁴
<i>APOA5 -1131T/C^d</i>	1,154 (1,076-1,239)	0,081	1,0 10 ⁻⁵
<i>LPL- CP^e</i>	0,920 (0,894-0,947)	-0,116	1,3 10 ⁻⁸
<i>LPL-D9N^d</i>	1,143 (1,000-1,303)	0,041	4,7 10 ⁻²
<i>LPL-N291S^d</i>	1,202 (1,048-1,369)	0,055	6,9 10 ⁻³
<i>CETP-Taqlβ^f</i>	0,946 (0,886-1,009)	0,034	9,3 10 ⁻²

Se excluyeron los sujetos que tomaban tratamiento hipolipemiante y una persona con TG > 1.000 mg/dl (n = 1.731). R² = 0,30.

^a Coeficiente multiplicativo e intervalo de confianza al 95% del efecto de cada variante obtenido tras deshacer la transformación logarítmica.

^b Coeficiente Beta estandarizado.

^c Homocigotos ε2ε2 o heterocigotos (ε2ε3 y ε2ε4) frente al grupo referencia (no portadores de ε2).

^d Portadores del alelo menos frecuente (homocigotos y heterocigotos) frente a los homocigotos más frecuentes (grupo referencia).

^e Combinación protectora: una variante protectora o dos protectoras frente al grupo referencia (ningún protector).

^f Homocigotos menos frecuentes frente a los homocigotos más frecuentes y heterocigotos (referencia).

significativas entre los polimorfismos y el sexo), se mantuvo el análisis del grupo completo de trabajadores para el resto del estudio.

En la tabla 6 se muestra la frecuencia de portadores de las variantes en los grupos de sujetos con y sin HTG. Se encontraron diferencias significativas para los alelos ε4 de *APOE* y -1131C de *APOA5* (mayor frecuencia en el grupo de HTG) y para la combinación de polimorfismos protectores (HindIII/S447X) de *LPL*, que aparecieron con menor frecuencia en el grupo de HTG.

Análisis de las interacciones entre las variantes y los factores ambientales

El análisis de las interacciones potenciales se realizó mediante contrastes múltiples al introducir en el modelo de regresión lineal, uno por uno, los factores de interacción de dos términos entre las variantes genéticas con efecto significativo previo y los factores secundarios: consumo de tabaco, de alcohol, edad, perímetro de cintura, obesidad abdominal, glucemia, glucemia elevada e hipertensión. Mediante este procedimiento no se obtuvo ninguna interacción significativa tras aplicar la corrección de Bonferroni. Sólo se encontró una interacción con un nivel de significación inferior a 0,05 entre el alelo ε4 de *APOE* y la obesidad abdominal (B, 1.164; IC al 95%, 1.001-1.356; p = 0,049).

Discusión

Nuestro estudio describe por primera vez el análisis simultáneo del polimorfismo de *APOE* y de variantes comunes de los genes *APOA5* (S19W y -1131T/C), *LPL* (D9N, N291S, Pvull,

HindIII y S447X), *LIPC* (-250G/A) y *CETP* (Taqlβ) en relación a los niveles de TG en una población mediterránea española amplia y bien caracterizada.

Los resultados de nuestro trabajo muestran claramente un efecto independiente y aditivo de algunas de las variantes determinadas: elevador de los niveles de TG en el caso del alelo ε4 de *APOE*, de los polimorfismos de *APOA5* S19W y -1131T/C y de las variantes de *LPL* D9N y N291S y protector o reductor en el caso de los polimorfismos HindIII y S447X de *LPL*. Por otra parte, en nuestra población, las variantes Pvull (*LPL*), -250G/A (*LIPC*) y Taqlβ (*CETP*) no mostraron asociación con los niveles de TG. Además, nuestros resultados sugieren que el efecto del alelo *APOE*-ε4 podría estar modulado por la interacción con la obesidad abdominal.

La frecuencia del alelo ε4 en nuestra población (9,6%) está dentro del rango descrito para las poblaciones del sur de Europa²⁸, si bien es algo mayor que la descrita en otras poblaciones laborales españolas: 7,8% en población madrileña²⁹, 7,5% en las Islas Canarias³⁰ y 7,1% en población valenciana¹¹.

Las frecuencias de los alelos *APOA5* 19W y -1131C encontradas por nosotros (6,2 y 6,8%, respectivamente) son similares a las calculadas en población caucásica de distinta zona geográfica¹³ y similar a la descrita recientemente en la población española del estudio EPiGEM³¹.

En nuestra población la frecuencia de portadores de los polimorfismos D9N y N291S del gen *LPL* resultó alrededor del 3%, es decir, entre el 1 y el 7% descrito en sujetos caucásicos sanos^{32,33}, si bien, en nuestro conocimiento, en estos estudios no se analiza ninguna población del entorno mediterráneo de este tamaño. En cuanto a los polimorfismos protectores de *LPL*, HindIII y S447X, las frecuencias alélicas determinadas en nuestra población están en el rango de otras poblaciones europeas³⁴ y son ligeramente inferiores a las encontradas en otra población española mediterránea¹⁷.

Las asociaciones significativas encontradas en nuestro trabajo entre las variantes genéticas y los niveles de TG que les atribuyen un efecto elevador (alelo ε4, polimorfismos S19W, -1131T/C, D9N, N291S) o reductor (variantes HindIII y S447X) de TG están de acuerdo con la mayoría de los estudios publicados anteriormente^{11,12,15}, siendo la primera vez que se describe su análisis simultáneo en un población de este tamaño y, por tanto, el efecto independiente de cada una de ellas.

Para las variantes analizadas hay estudios que permiten considerarlas funcionales y justificar las asociaciones encontradas por nosotros y otros autores. En el caso del polimorfismo de *APOE*, según el metaanálisis de Dallongeville et al³⁵, tanto los portadores de ε2 como los de ε4 podrían asociarse a cambios en los niveles de TG. En nuestro trabajo sólo los portadores de ε4 se asocian independientemente a concentraciones más altas de TG. Se ha descrito que las partículas de VLDL están relativamente enriquecidas en la isoforma ε4³⁶. Dado que las lipoproteínas más ricas en *APOE* son peor sustrato para la lipólisis, debido a su efecto inhibitorio³⁷ el enriquecimiento en la isoforma ε4 propiciaría una lipólisis parcial. En este sentido es plausible una interacción entre una situación de lipólisis disminuida por la presencia de este alelo y una situación de sobreproducción de partículas ricas en TG, por ejemplo, cuando el perímetro de cintura es elevado³⁸. En nuestro trabajo, la interacción entre ambos factores muestra un coeficiente

Tabla 6 Frecuencia (%) de portadores de los polimorfismos según la presencia o ausencia de hipertrigliceridemia

Variantes	HTG (n = 417)	No HTG (n = 1.408)	Total (n = 1.825)	p ^a
APOE				
Alelo ε4 (n = 328)	23,3	16,4	17,9	0,002
Alelo ε2 (n = 204)	12,2	10,9	11,2	NS
APOA5				
S19W (n = 240)	14,6	12,7	13,2	NS
-1131T/C (n = 216)	14,9	10,9	11,8	0,031
LPL				
1 protector ^b (n = 519)	27,6	28,7	28,4	0,001
2 protectores ^c (n = 390)	15,3	23,2	21,4	
D9N (n = 57)	3,8	2,9	3,1	NS
N291S (n = 54)	3,4	2,8	2,9	NS
Pvull (n = 1.342)	73,1	73,7	73,5	NS
LIPC				
-250G/A (n = 394)	42	41,1	41,3	NS
CETP				
Taq1β (n = 1136)	62,8	62,1	62,3	NS

^a Valor p para la prueba de χ^2 . NS = p > 0,1. Se indica la frecuencia en los grupos de portadores de las variantes (heterocigotos y homocigotos para los alelos menos frecuentes).

^b Portadores de HindIII (n = 515) o S447X (n = 4).

^c Portadores de HindIII y S447X.

B con una magnitud importante de TG; sin embargo, no alcanza la significación estadística con el método de análisis empleado, probablemente debido a un problema de potencia estadística limitada, por lo que merece la pena ser valorada en otros estudios. También se ha mostrado que el efecto inhibitor de la apolipoproteína E es más pronunciado en la isoforma ε2³⁹, que además se asocia a concentraciones más altas de la apolipoproteína. Por lo tanto, las partículas que contengan esa isoforma también serían peores sustratos para la enzima *LPL*, si bien en nuestros trabajadores no hemos podido poner de manifiesto un efecto elevador de TG del alelo ε2.

El efecto funcional de la variante S19W de *APOA5* que hemos determinado ha sido estudiado por Talmud et al⁴⁰, que muestran una función alterada del péptido señal de la apolipoproteína que afectaría a su secreción. Por otra parte, existen estudios en los que la presencia de la variante del promotor, -1131T/C, se asocia con niveles más bajos de Apo AV⁴¹, y además también está descrita, para los dos polimorfismos de *APOA5* analizados, la asociación con niveles más bajos de actividad *LPL*⁴². Asumiendo, por tanto, un efecto de los polimorfismos de *APOA5* estudiados sobre la lipólisis, la interacción entre estas variantes con factores secundarios asociados con liposíntesis de novo sería esperable; sin embargo, tal efecto no se manifiesta en nuestra población. En el estudio de Evans et al⁴³ se describe la asociación entre la variante -1131T/C de *APOA5* y un aumento significativo en los niveles de TG en pacientes con hiperlipidemia sólo cuando tenían sobrepeso. En nuestra población, muy diferente de la estudiada por Evans et al, el efecto tanto de -1131T/C como de S19W es claramente independiente de los factores secundarios analizados. Por otra parte, se da la circunstancia de que los portadores hipertrigliceridémicos de la variante S19W presentan significativamente menos prevalencia de obesidad abdominal que los hipertrigliceridémicos

no portadores, de forma que no habría casos suficientes en los que valorar una posible interacción entre el factor genético y el factor ambiental.

Está descrito que los polimorfismos no sinónimos D9N y N291S afectan, respectivamente, a la secreción y dimerización de la enzima *LPL*⁴⁴, y se ha sugerido⁴⁵ que el efecto que estas modificaciones tienen sobre la actividad *LPL* —y por tanto sobre la lipólisis— puede no ser suficiente como para alterar los niveles de TG; sin embargo, en nuestro estudio ambos polimorfismos se asocian, independientemente del perímetro de cintura y otros factores de confusión, con un efecto elevador significativo (20 y 14% de aumento, respectivamente; tabla 5). Lógicamente, la baja frecuencia de estos polimorfismos reduce su impacto poblacional.

En relación a las variantes protectoras de *LPL*, es interesante señalar que Razzaghi et al⁴⁶ han descrito un efecto funcional independiente para la variante intrónica HindIII que parece situarse en un región reguladora¹⁸. En el caso de la variante S447X, la eliminación de los dos últimos aminoácidos del extremo C terminal provoca un aumento de la actividad de la enzima⁴⁷. La proximidad física entre estos dos polimorfismos, que están en casi total desequilibrio de ligamiento, dificulta la atribución de un efecto independiente a las dos variantes; sin embargo, en nuestra población hemos evaluado la presencia de un solo alelo protector, que en el 96% de los casos corresponde a la variante HindIII, estando asociada significativamente a un efecto reductor independiente (tabla 5).

Aunque nuestro estudio avala resultados de estudios previos y aporta nuevos hallazgos con resultados consistentes, es necesario señalar ciertas limitaciones. Si se acepta que el efecto de los polimorfismos genéticos depende del contexto genético y ambiental en el que éstos se analizan, es lógico pensar que las características inherentes a la población analizada (área geográfica, edad, estado de salud) son las que

condicionan principalmente los resultados obtenidos. Por otra parte, dado el carácter multifactorial y multigénico de la variable que estamos analizando —los niveles de TG—, es muy probable que el análisis de otras variantes en otros genes y otras variables ambientales como la dieta y el ejercicio físico, no consideradas en este trabajo, ayuden a explicar mejor la variabilidad en los niveles de TG y pongan de manifiesto interacciones hasta ahora no descritas que expliquen la manifestación de HTG.

En conclusión, nuestro trabajo muestra la implicación del alelo $\epsilon 4$ de *APOE* y de las variantes S19W y -1131T/C de *APOA5* y D9N, N291S, HindIII y S447X de *LPL* sobre los cambios en los niveles de TG de la población analizada, y sugiere un efecto modulador del perímetro de cintura sobre el alelo $\epsilon 4$.

Financiación

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por una beca FEA/SEA 2006 para la Investigación Clínico-Epidemiológica concedida en el XIX congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis celebrado en Santander.

Contribución de los autores

Todos los autores cumplen las condiciones de autoría requeridas por la revista para ser firmantes del artículo.

Conflicto de intereses

Se declara un conflicto de interés no económico en relación con el trabajo de genotipado por estar presentadas las siguientes solicitudes de patente:

1. Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para el genotipado del polimorfismo genético -1131T/C del gen *APOA5*. Ariza MJ, Rioja J, Valdivielso P, Sánchez-Chaparro MA, González-Santos P. Número de solicitud: P200802184.
2. Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para el genotipado del polimorfismo genético -250 G/A del gen *LPL*. Ariza MJ, Rioja J, Valdivielso P, Sánchez-Chaparro MA, González-Santos P. Número de solicitud: P200802185.
3. Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para el genotipado del polimorfismo genético S447X del gen *LPL*. Ariza MJ, Rioja J, Valdivielso P, Sánchez-Chaparro MA, González-Santos P. Número de solicitud: P200802182.
4. Conjunto de cebadores, sondas, procedimiento y kit para el genotipado del polimorfismo genético S19W del gen *APOA5*. Ariza MJ, Rioja J, Valdivielso P, Sánchez-Chaparro MA, González-Santos P. Número de solicitud: P200802183.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las doctoras Guadalupe Requena Santos y Martha Cabrera Sierra su contribución en la obtención y depuración de los datos clínicos.

Bibliografía

1. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007;115:450–8.
2. Valdivielso P, Sanchez-Chaparro MA, Calvo-Bonacho E, Cabrera-Sierra M, Sainz-Gutierrez JC, Fernandez-Labandera C, et al. Association of moderate and severe hypertriglyceridemia with obesity, diabetes mellitus and vascular disease in the Spanish working population: results of the ICARIA study. *Atherosclerosis*. 2009;207:573–8.
3. National Cholesterol Education Program. 2007. Disponible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3xsum.pdf>.
4. Visvikis-Siest S, Marteau JB. Genetic variants predisposing to cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:139–51.
5. Mahley RW, Rail Jr SC. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507–37.
6. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res*. 2002;43:1997–2006.
7. Merkel M, Heeren J. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! *J Clin Invest*. 2005;115:2694–6.
8. Jansen H, Verhoeven AJ, Sijbrands EJ. Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein? *J Lipid Res*. 2002;43:1352–62.
9. Dullaart RP, Sluiter WJ. Common variation in the CETP gene and the implications for cardiovascular disease and its treatment: an updated analysis. *Pharmacogenomics*. 2008;9:747–63.
10. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, et al. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298:1300–11.
11. Corella D, Guillen M, Saiz C, Portoles O, Sabater A, Cortina S, et al. Environmental factors modulate the effect of the APOE genetic polymorphism on plasma lipid concentrations: ecogenetic studies in a Mediterranean Spanish population. *Metabolism*. 2001;50:936–44.
12. Hubacek JA. Apolipoprotein A5 and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43:897–902.
13. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet*. 2002;11:3031–8.
14. Wang J, Ban MR, Zou GY, Cao H, Lin T, Kennedy BA, et al. Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet*. 2008;17:2894–9.
15. Wittrup HH, Andersen RV, Tybjaerg-Hansen A, Jensen GB, Nordestgaard BG. Combined analysis of six lipoprotein lipase genetic variants on triglycerides, high-density lipoprotein, and ischemic heart disease: cross-sectional, prospective, and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1438–45.
16. Hu Y, Liu W, Huang R, Zhang X. A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases. *J Lipid Res*. 2006;47:1908–14.
17. Corella D, Guillen M, Saiz C, Portoles O, Sabater A, Folch J, et al. Associations of LPL and APOC3 gene polymorphisms on plasma lipids in a Mediterranean population: interaction with tobacco smoking and the APOE locus. *J Lipid Res*. 2002;43:416–27.
18. Chen Q, Razzaghi H, Demirci FY, Kamboh MI. Functional significance of lipoprotein lipase HindIII polymorphism associated with the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2008;200:102–8.
19. Tang W, Apostol G, Schreiner PJ, Jacobs Jr DR, Boerwinkle E, Fornage M. Associations of lipoprotein lipase

- gene polymorphisms with longitudinal plasma lipid trends in young adults: the CARDIA Study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:179-86.
20. Socquard E, Durlach A, Clavel C, Nazeyrollas P, Durlach V. Association of HindIII and PvuII genetic polymorphisms of lipoprotein lipase with lipid metabolism and macrovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*. 2006;32:262-9.
 21. Cagatay P, Susleyici-Duman B, Ciftci C. Lipoprotein lipase gene PvuII polymorphism serum lipids and risk for coronary artery disease: meta-analysis. *Dis Markers*. 2007;23:161-6.
 22. Valdivielso P, Ariza MJ, de la Vega-Roman C, Gonzalez-Alegre T, Rioja J, Ulzurrun E, et al. Association of the -250G/A promoter polymorphism of the hepatic lipase gene with the risk of peripheral arterial disease in type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications*. 2008;22:273-7.
 23. Brisson D, St-Pierre J, Santure M, Hudson TJ, Despres JP, Vohl MC, et al. Genetic epistasis in the VLDL catabolic pathway is associated with deleterious variations on triglyceridemia in obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31:1325-33.
 24. Sanchez Chaparro MA, Calvo Bonacho E, Gonzalez Quintela A, Cabrera M, Sainz JC, Fernandez-Labander C, et al. High cardiovascular risk in Spanish workers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;21:231-6.
 25. Sanchez-Chaparro MA, Roman-Garcia J, Calvo-Bonacho E, Gomez-Larios T, Fernandez-Meseguer A, Sainz-Gutierrez JC, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors in the Spanish working population. *Rev Esp Cardiol*. 2006;59:421-30.
 26. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al., on behalf of the SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: The SCORE project. *Eur Heart J*. 2003;24:987-1003.
 27. R Development Core Team. R: A language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2008. ISBN 3-900051-07-0. Disponible en: <http://www.R-project.org>.
 28. Haddy N, De Bacquer D, Chemaly MM, Maurice M, Ehnholm C, Evans A, et al. The importance of plasma apolipoprotein E concentration in addition to its common polymorphism on inter-individual variation in lipid levels: results from Apo Europe. *Eur J Hum Genet*. 2002;10:841-50.
 29. Gomez-Coronado D, Alvarez JJ, Entrala A, Olmos JM, Herrera E, Lasuncion MA. Apolipoprotein E polymorphism in men and women from a Spanish population: allele frequencies and influence on plasma lipids and apolipoproteins. *Atherosclerosis*. 1999;147:167-76.
 30. Muros M, Rodriguez-Ferrer C. Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4. *Atherosclerosis*. 1996;121:13-21.
 31. Perez-Martinez P, Corella D, Shen J, Arnett DK, Yiannakouris N, Tai ES, et al. Association between glucokinase regulatory protein (GCKR) and apolipoprotein A5 (APOA5) gene polymorphisms and triacylglycerol concentrations in fasting, postprandial, and fenofibrate-treated states. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:391-9.
 32. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation*. 1999;99:2901-7.
 33. Talmud PJ, Stephens JW. Lipoprotein lipase gene variants and the effect of environmental factors on cardiovascular disease risk. *Diabetes Obes Metab*. 2004;6:1-7.
 34. Humphries SE, Nicaud V, Margalef J, Tiret L, Talmud PJ. Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides: the European Atherosclerosis Research Study (EARS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:526-34.
 35. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res*. 1992;33:447-54.
 36. Steinmetz A, Jakobs C, Motzny S, Kaffarnik H. Differential distribution of apolipoprotein E isoforms in human plasma lipoproteins. *Arteriosclerosis*. 1989;9:405-11.
 37. Rensen PC, van Berkel TJ. Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1996;271:14791-9.
 38. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1225-36.
 39. Hara M, Iso ON, Satoh H, Noto H, Togo M, Ishibashi S, et al. Differential effects of apolipoprotein E isoforms on lipolysis of very low-density lipoprotein triglycerides. *Metabolism*. 2006;55:1129-34.
 40. Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem*. 2005;280:28215-20.
 41. Ishihara M, Kujiraoka T, Iwasaki T, Nagano M, Takano M, Ishii J, et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration. *J Lipid Res*. 2005;46:2015-22.
 42. Kovar J, Adamkova V. Lipoprotein lipase activity determined in vivo is lower in carriers of apolipoprotein A-V gene variants 19W and -1131C. *Physiol Res*. 2007;57:555-61.
 43. Evans D, Buchwald A, Beil FU. The single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 (APOA5) gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia. *J Mol Med*. 2003;81:645-54.
 44. Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1997;135:145-59.
 45. Talmud PJ. Genetic determinants of plasma triglycerides: impact of rare and common mutations. *Curr Atheroscler Rep*. 2001;3:191-9.
 46. Razzaghi H, Aston CE, Hamman RF, Kamboh MI. Genetic screening of the lipoprotein lipase gene for mutations associated with high triglyceride/low HDL-cholesterol levels. *Hum Genet*. 2000;107:257-67.
 47. Rip J, Nierman MC, Ross CJ, Jukema JW, Hayden MR, Kastelein JJ, et al. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1236-45.