

**ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL GEN APO E EN PACIENTES CON  
DISLIPIDEMIA DE LA CIUDAD DE VALLEDUPAR**

**AUTOR: MARÍA ISABEL MOSQUERA HEREDIA**

**DIRECTOR: CARLOS ARTURO SILVERA REDONDO Md PhD**

**UNIVERSIDAD DEL NORTE  
DIVISIÓN SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BARRANQUILLA COLOMBIA**

**2012**

**CARTA DE CALIFICACIÓN**

**NOTA DE ACEPTACION**

---

---

---

---

---

**Presidente del jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

## **DEDICATORIA**

A Dios quien programó mi existencia.

A mi esposo Andrés, por su gran amor y apoyo incondicional.

A mi hijo Alejandro, quien me motivó a seguir estudiando. A mi hijo Andrés

David por llenar mi vida de felicidad.

A mi madre Isabel, por su amor y especial motivación.

A mis hermanos y sobrinos por todo su cariño.

A mis profesores de quienes aprendí lo mejor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Norte de Barranquilla y al cuerpo de profesores de la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. En especial al Doctor Carlos Silvera por sus enseñanzas y constante orientación.

A José Luis Rico, Isis Arias y Martha Ruiz por su comprensión, apoyo y asesoría técnica.

Y a todos aquellos que me acompañaron incondicionalmente.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>PÁG</b>
Figura 1. Organización molecular del gen APOE	8
Figura 2. Estructura de la apolipoproteína E	13
Figura 3. Participación de la Apolipoproteína E en la depuración plasmática de remanente de Quilomicrón	23
Figura 4. Participación de la Apolipoproteína E en la depuración plasmática de IDL y LDL	24

## LISTA DE TABLAS

	<b>PÁG</b>
Tabla 1. Características de las principales apolipoproteínas humanas.	6
Tabla 2. Frecuencias relativas de los alelos del gen apoE en diferentes poblaciones.	10
Tabla 3. Frecuencias porcentuales de los genotipos del gen ApoE en diferentes poblaciones.	11
Tabla 4. Caracterización de las variables del estudio.	33
Tabla 5. Fragmentos obtenidos post-digestión con la enzima de restricción HhaI.	36
Tabla 6. Puntos de corte del IMC para adultos según la Organización Mundial de la salud.	37
Tabla 7. Distribución de los pacientes dislipidémicos del programa de promoción y prevención de Hipertensión arterial del Hospital Eduardo Arredondo Daza de Valledupar según edad y sexo.	40

Tabla 8. Perfil de lipoproteínas e IMC de la población en estudio.	40
Tabla 9. Tipo de Dislipedemia según alelos y genotipos del gen ApoE en la población estudiada.	42
Tabla 10. Características bioquímicas según los alelos y genotipos del gen ApoE en pacientes dislipidémicos de Valledupar.	43
Tabla 11. Asociación entre los alelos de ApoE y los diferentes tipos de Dislipidemias.	45
Tabla 12. Asociación entre los genotipos de ApoE y los diferentes tipos de Dislipidemias.	46

## RESUMEN

Las dislipidemias comprenden un grupo de trastornos del metabolismo de los lípidos, los cuales se alteran en niveles que involucran un riesgo para la salud; en este sentido, se convierten en un factor predisponente para el desarrollo de enfermedades Cardiovasculares, constituyendo un grave problema de salud pública.

En muchos casos, las dislipidemias resultan de la interacción de factores genéticos y medioambientales. Uno de los marcadores genéticos más importante es el polimorfismo del gen ApoE y sus correspondientes tipos de Apolipoproteína E, principalmente porque junto con la Apo B sirven como ligando para el receptor ApoB/E presente en la mayoría de las membranas celulares permitiendo que LDL ceda colesterol a las células periféricas. Por su parte, la apolipoproteína E de los remanentes de quilomicrón y de VLDL interactúan con receptores hepáticos específicos con el fin de ser depurados del plasma. Con lo anterior se tiene que los polimorfismos del gen ApoE influyen de manera directa en la homeostasis lipídica. Su variación genética sumada a factores medioambientales podría precipitar un aumento de lípidos en sangre lo cual se relaciona con enfermedad cardiovascular.

En este estudio, se analiza la frecuencia alélica y genotípica del gen ApoE, en 100 pacientes con dislipidemia de la ciudad de Valledupar, Colombia, diagnosticada de acuerdo a las guías del Adult Treatment Panel III (ATP III) y se establece la asociación de riesgo entre el polimorfismo del gen ApoE y los



diferentes tipos de dislipidemia. Se trata de un estudio descriptivo de corte transversal. El ADN genómico fue extraído de sangre periférica y los genotipos fueron determinados mediante PCR-RFLP. El alelo  $\epsilon 3$  fue el más frecuente (48%), seguido por  $\epsilon 4$  (46,5%) y el  $\epsilon 2$  (5,5%). Los genotipos observados en su orden fueron:  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (72%),  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (17%),  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (7%) y  $\epsilon 2/\epsilon 4$  (4%). Los genotipos homocigotos para  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 4$  no se observaron. Los pacientes con alelo  $\epsilon 4$  presentaron mayores niveles de Colesterol Total y cLDL y cifras más bajas de cHDL con respecto a los pacientes con alelos  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 2$ . Aquellos individuos con el alelo  $\epsilon 2$  mostraron una tendencia opuesta a  $\epsilon 4$  aunque se relacionaron con Hipertrigliceridemia. La dislipidemia más frecuente fue la "Hiperlipidemia (Hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia) más cHDL bajo"; predominando en individuos con alelo  $\epsilon 4$ . Igualmente estos pacientes tenían mayor riesgo de desarrollar Hipercolesterolemia aislada y aquellos con alelo  $\epsilon 2$  Hipertrigliceridemia aislada. En esta población es evidente la influencia del polimorfismo del gen ApoE sobre los niveles de Lípidos. Se confirma que sujetos con el alelo  $\epsilon 4$  pueden desarrollar un efecto aterogénico por estar relacionado con cifras elevadas de colesterol total, cLDL y bajos niveles de cHDL. Así mismo individuos con alelo  $\epsilon 2$  podrían tener un efecto antiaterogénico aunque se relacione en algunos casos con hipertrigliceridemia.

**Palabras claves:** Polimorfismo genético, Apolipoproteína E, dislipidemia, enfermedad cardiovascular.

## ABSTRACT

Dyslipidemias are a group of disorders of lipid metabolism, which alter levels involving a health risk in this sense, become a predisposing factor for developing cardiovascular diseases, a serious health problem public.

In many cases, dyslipidemia result from the interaction of genetic and environmental factors. One of the most important genetic markers ApoE gene polymorphism and the corresponding rates of apolipoprotein E, mainly because together with the Apo B serve as a ligand for the receptor ApoB / E present in most cell membranes allowing LDL cholesterol yield to the peripheral cells. For its part, apolipoprotein E, chylomicron remnants and VLDL interacts with specific hepatic receptors to be purified from plasma. It is with the Apolipoprotein E polymorphisms influence directly in lipid homeostasis. Its genetic variation coupled with environmental factors may precipitate an increase in blood lipids which is associated with cardiovascular disease.

In this study, we analyzed allelic and genotypic frequency of the ApoE gene in 100 patients with dyslipidemia in the city of Valledupar, Colombia, diagnosed by the clinical laboratory according to guidelines of the Adult Treatment Panel III (ATP III) and establishes the risk association between ApoE gene polymorphism and the different types of dyslipidemia. This is a cross sectional study. DNA was extracted from peripheral blood and genotypes were determined by PCR-RFLP. The  $\epsilon 3$  allele was most frequent (48%), followed by  $\epsilon 4$  (46.5%) and  $\epsilon 2$  (5.5%). The genotypes were observed in its order:  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (72%),  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (17%),  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (7%)

and  $\epsilon 2/\epsilon 4$  (4%). The genotypes  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 4$  homozygotes were not observed. Patients with  $\epsilon 4$  allele had higher levels of total cholesterol and LDL and HDL cholesterol lower figures compared to patients with  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 2$  alleles. Those individuals with the  $\epsilon 2$  allele showed a trend opposite to  $\epsilon 4$  although related to hypertriglyceridemia. Dyslipidemia was the most common Hyperlipidemia more low HDL-C", predominantly in individuals with  $\epsilon 4$  allele. Also these patients had higher risk of isolated hypercholesterolemia  $\epsilon 2$  allele and those with isolated hypertriglyceridemia. In this population is evident the influence of Apo E polymorphism on levels of lipids. It is confirmed that subjects with  $\epsilon 4$  allele may develop an atherogenic effect to be correlated with elevated total cholesterol, LDL and low HDL cholesterol. Also individuals with  $\epsilon 2$  allele may have anti-atherogenic effect but is related in some cases with hypertriglyceridemia.

**Keywords:** Genetic polymorphism, apolipoprotein E, dyslipidemia, cardiovascular disease

## TABLA DE CONTENIDO

	PÁG
Carta de calificación	I
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Lista de Figuras	IV
Lista de Tablas	V
Resumen	VI
Abstract	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PROBLEMA	2
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1 Lipoproteínas	4
3.2 Polimorfismos del gen ApoE	7
3.3 Estructura de la apolipoproteína E	12
3.4 Función de la apolipoproteína E y su relación con dislipidemia	13
3.4.1 Dislipidemia	13
3.4.1.1 Hipercolesterolemia aislada	14
3.4.1.2 Hipertrigliceridemia aislada	16
3.4.1.3 Hiperlipidemia combinada	17
3.4.1.4 cHDL bajo aislado	19

3.4.1.5 Hiperlipidemia más cHDL bajo	20
3.4.2 Participación de la apolipoproteína E en la homeostasis lipídica	20
3.4.3 Polimorfismo de ApoE y dislipidemia	24
4. OBJETIVOS	30
4.1 General	30
4.2 Específicos	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Tipo de estudio	31
5.2 Población de estudio y muestra	31
5.3 Variables del estudio	33
5.4 Metodología	34
5.5 Análisis de la información	37
5.6 Consideraciones éticas	38
6. RESULTADOS	39
7. DISCUSIÓN	47
7.1 Frecuencia alélica y genotípica del gen ApoE en los pacientes estudiados	47
7.2 Polimorfismos del gen ApoE y su impacto sobre los niveles de lípidos plasmáticos	51

7.3 Asociación entre los alelos y genotipos del gen ApoE con los diferentes tipos de dislipidemias	55
8. CONCLUSIONES	58
9. BIBLIOGRAFIA	59
ANEXO 1	

## 1. INTRODUCCIÓN

Las dislipidemias son un conjunto de enfermedades que tienen en común presentar concentraciones anormales de lipoproteínas plasmáticas. Estas pueden ser el resultado de la interacción de varios factores biológicos y ambientales<sup>1</sup>.

Uno de los principales factores de riesgo biológico para la alteración de las fracciones lipoproteicas sanguíneas, es el componente genético, ya que se ha podido demostrar que la incidencia familiar de dislipidemias esta dada principalmente por la interacción de mutaciones génicas y algunos factores medioambientales.

El polimorfismo del gen ApoE es uno de los marcadores genéticos más importante para el desarrollo de las dislipidemias, debido a que algunas de las mutaciones en este gen se han podido asociar con variaciones significativas del perfil lipídico<sup>2</sup>.

En este estudio se analiza la frecuencia alélica y genotípica del gen ApoE en pacientes con dislipidemia de la ciudad de Valledupar y se establece la asociación de riesgo entre el polimorfismo de ApoE y los diferentes tipos de dislipidemia.

## 2. PROBLEMA

Las dislipidemias son un conjunto de patologías caracterizadas por alteraciones en la concentración de lípidos plasmáticos en niveles que involucran un riesgo para la salud. En especial porque estas constituyen uno de los factores de riesgo biológico más relevante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, principal causa de muerte en el mundo<sup>3, 4</sup>.

La Encuesta Nacional de Salud realizada en el 2007 por el Ministerio de La Protección Social, CENDEX de la universidad Javeriana y Colciencias, informa que en Colombia el 8% de los adultos con edades entre los 18 y los 69 años presentaron cifras de colesterol total igual o superiores a 240 mg/dL y que el 63% de estos individuos presentaron niveles inferiores a 40 mg/dL de cHDL.

Específicamente en la región Atlántica, en la cual se incluye al departamento del Cesar y a su capital, la ciudad de Valledupar, esta encuesta indica que al 4,2% de los adultos incluidos en esta submuestra se les determinaron niveles superiores a los 240 mg/dL de colesterol total y al 69% de ellos cifras inferiores a los 40 mg/dL de cHDL.

Existen numerosas evidencias que apoyan la participación de factores genéticos en la variabilidad de los lípidos plasmáticos<sup>1</sup>. Uno de ellos es el polimorfismo del gen ApoE ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ), dado que la apolipoproteína que este codifica está implicada en el transporte y distribución de los lípidos entre los tejidos; por lo tanto la variación genética en sus niveles y estructura,



relacionada con factores medioambientales o de estilo de vida podrían ocasionar un aumento de lípidos en sangre, lo cual en muchos de los casos se relaciona con enfermedad cardiovascular. En este sentido, se ha reportado que aquellos individuos con alelo  $\epsilon 2$  presentan niveles más elevados de triglicéridos, aunque también se les ha podido asociar un efecto antiaterogénico<sup>5</sup>. Por su parte, otros estudios han concluido que el alelo  $\epsilon 4$  puede influir en el incremento de niveles de colesterol total y cLDL y en la disminución de cHDL. Igualmente se ha demostrado que este alelo se relaciona con mayores probabilidades de padecer enfermedad cardiovascular tanto en hombres como en mujeres <sup>6,7</sup>.

Hasta el momento se desconoce la distribución de los polimorfismos del gen ApoE en individuos de la ciudad de Valledupar; razón por la cual, este estudio tiene como objetivo determinar la frecuencia alélica y genotípica del gen ApoE en una muestra de pacientes dislipidémicos de esta ciudad.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 LIPOPROTEÍNAS**

Son partículas formadas por una fracción proteica denominada apolipoproteína (Apo) y una fracción lipídica, cuya función es la de solubilizar y transportar lípidos en el plasma<sup>8</sup>. Las principales lipoproteínas humanas se clasifican de acuerdo con su patrón de densidad en: Lipoproteína de baja densidad (LDL), Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), Lipoproteína de alta densidad (HDL), Lipoproteína de densidad intermedia (IDL) y Quilomicrón (QM).

Por lo general, las lipoproteínas son de forma esférica y su tamaño varía de 10 a 1200 nm. El colesterol anfipático y las moléculas de fosfolípido se localizan principalmente en la superficie de la lipoproteína como una monocapa simple, mientras que el triglicérido hidrófobo y las moléculas de éster de colesterol se encuentran en la región central o núcleo.

Las apolipoproteínas por su parte, se localizan en la superficie de las lipoproteínas, ayudándoles a mantener su integridad estructural y actuando como ligando para los receptores de células y como activadores e inhibidores de varias enzimas que modifican a las lipoproteínas. Estas están representadas por cinco tipos principales (A, B, C, D y E) algunos de los cuales se clasifican en subtipos <sup>8</sup>, como se describe en la Tabla 1.

Apo A: Se subdivide en varias subclases (AI, AII, AIV y otras) se sintetizan en hígado e intestino. Se transfieren activamente hacia y desde las HDL, VLDL y

QM. Sus principales funciones son activar la Lecitin Colesterol Aciltransferasa (LCAT), que esterifica el colesterol libre en las HDL y a nivel periférico, y transportar al colesterol libre desde el interior de la célula a la membrana, activando receptores apo AI con la intervención de los transportadores de colesterol ABCA1. Su catabolismo se lleva a cabo en hígado, riñón y tejidos extrahepáticos <sup>9</sup>.

Apo B: Tiene dos formas, la B-48 sintetizada a nivel intestinal y la B-100 a nivel hepático. La B-48 es componente de los QM y la B-100 de las VLDL, IDL y LDL. Participan en la regulación de la síntesis de VLDL y del transporte a receptores específicos. Su catabolismo es principalmente hepático <sup>10, 11</sup>.

Apo C: Se sintetiza a nivel hepático. Existen tres subclases: CI, CII y CIII. La Apo CII estimula la Lipoproteinlipasa (LPL) y la CIII la inhibe. La Apo CI estimula la LCAT.

Apo E: Se encuentra presente en varios tipos de lipoproteínas (LDL, VLDL y HDL), sirve como ligando para el receptor de LDL junto con apo B-100, y para el receptor LRP (Low density lipoprotein receptor-related protein) <sup>12, 13</sup>.

**TABLA 1. Características de las principales apolipoproteínas humanas.**

APOLIPROTEINA	PESO MOLECULAR (KD)	CONCENTRACIÓN EN PLASMA (mg/dL)	UBICACIÓN EN LIPOPROTEÍNAS PRINCIPALES	FUNCIÓN
Apo A-I	28,000	100-200	HDL	Estructural, activador LCAT, aceptor de lípidos ABCA1
Apo A-II	17,400	20-50	HDL	Estructural
Apo A-IV	44,000	10-20	Quilomicrones, VLDL, HDL	Estructural
Apo B-100	$5.4 \times 10^5$	70-125	LDL, VLDL	Estructural, ligando receptor de LDL
Apo B-48	$2.6 \times 10^5$	<5	Quilomicrones	Estructural, ligando aceptor de remanentes
Apo C-I	6,630	5-8	Quilomicrones, VLDL, HDL	Estructural
Apo C-II	8,900	3-7	Quilomicrones, VLDL, HDL	Estructural, cofactor de LPL
Apo C-III	9,400	10-12	Quilomicrones, VLDL, HDL	Estructural, inhibidor de LPL
Apo E	34,400	3-15	VLDL, HDL	Estructural, ligando receptor de LDL
Apo (a)	$(3-7) \times 10^5$	<30	Lp(a)	Estructural, inhibidor de plasminógeno

Fuente: Bishop M, Fody E, Schoeff L. Química clínica: Principios, procedimientos y correlaciones<sup>14</sup>.

Debido a que las apolipoproteínas desempeñan un papel importante en la homeostasis lipídica, las mutaciones en los genes que las codifican, relacionadas con factores medioambientales o con ciertos estilos de vida

podrían influir en el metabolismo de las lipoproteínas, ocasionando un aumento de lípidos en sangre o "dislipidemias", las cuales en mucho de los casos sin importar su causa, se relacionan con enfermedad cardiovascular.

Una de las apolipoproteínas involucradas es la Apo E, importante por su participación en la depuración plasmática de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y de los remanentes de VLDL (IDL) y de Quilomicrón (rQM).

### **3.2 POLIMORFISMOS DEL GEN APOE:**

El gen que codifica para la Apo E se encuentra en la región 19q13.2-q13.3. ligado a los genes de la Apo CI, pseudogen Apo CI y el de la Apo CII<sup>15</sup>.

El gen ApoE tiene un tamaño de 3597 pb y consta de 4 exones y 3 intrones.

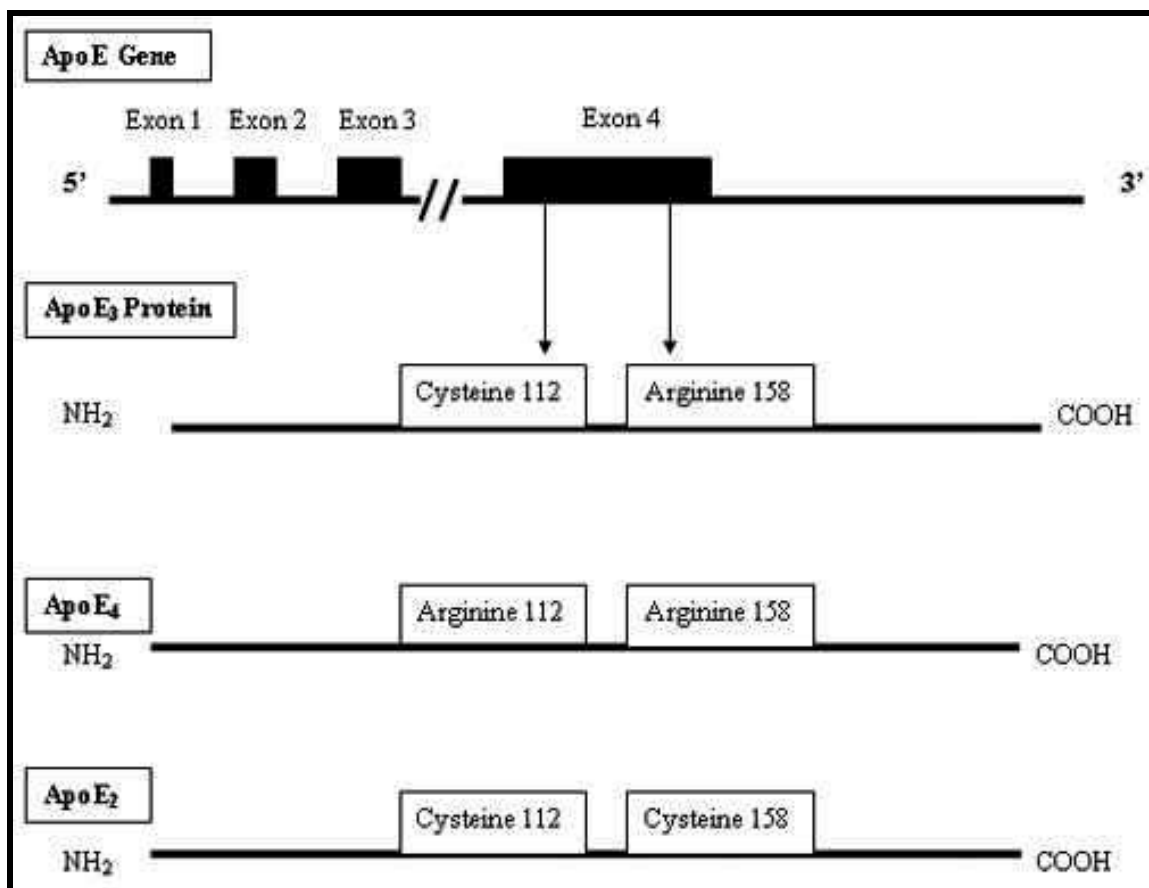
Este gen tiene tres alelos comunes llamados  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  que codifican para las tres isoformas E2, E3 y E4 de la proteína. Los alelos se producen por cambios de nucleótidos en el exón 4 del gen, en los codones 112 y 158.

Así, tenemos que el alelo  $\epsilon 3$  se traduce en una proteína que contiene Cisteína en la posición 112 y Arginina en la 158<sup>16, 17</sup> (Figura 1), y es considerado como el alelo salvaje por ser el más frecuente en la población caucásica, encontrándose con una frecuencia aproximada del 78% .

Por su parte el alelo  $\epsilon 2$  da origen a una proteína que tiene Cisteína en el residuo 112 y en el 158; y el alelo  $\epsilon 4$  a una proteína que tiene arginina en ambas posiciones<sup>16, 17</sup>. Éstos se encuentran con una frecuencia del 7 y del 15% respectivamente en la población caucásica.

Teniendo en cuenta todas las combinaciones de los alelos, se tiene que dan lugar a tres genotipos homocigotos  $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$  y  $\epsilon 4/\epsilon 4$  y a tres genotipos heterocigotos  $\epsilon 3/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 3$  y  $\epsilon 4/\epsilon 2$ .

**Figura 1. Organización molecular del gen ApoE.**



Fuente: Berglund Lars. Apolipoproteina E: Un candidato importante para la interacción entre genes y nutrientes?<sup>18</sup>

Se ha estudiado ampliamente la distribución de los polimorfismos del gen ApoE alrededor del mundo, la cual varía de acuerdo con las diferencias geográficas y

étnicas de las diferentes poblaciones<sup>5, 15-30</sup>. La Tabla número 2 muestra la frecuencia alélica del polimorfismo del gen ApoE en 13 regiones. En el continente Europeo, la frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  disminuye en dirección Norte-Sur en oposición al alelo  $\epsilon 3$ <sup>31</sup>. En países como Finlandia, Suecia y Alemania se reporta una prevalencia de este alelo cercana al 20%, mientras que en Cerdeña, la Península Ibérica e Italia oscila entre el 5 y el 10%<sup>14, 25-26, 28</sup>. En el caso de América el alelo más frecuente es  $\epsilon 3$  y en su orden le siguen  $\epsilon 4$  y  $\epsilon 2$ <sup>5, 21, 23, 32</sup>; sin embargo en estudios realizados en indígenas de este continente, no se ha reportado la presencia del alelo  $\epsilon 2$ <sup>20-21</sup>. En un estudio realizado en 75 indígenas Mazatecos de México<sup>21</sup> se encontró que el alelo  $\epsilon 3$  era más frecuente y  $\epsilon 4$  menos frecuente, en comparación con otros grupos amerindios<sup>20</sup>. Como se ha mencionado, el alelo  $\epsilon 2$  no se observó coincidiendo con lo reportado en otros estudios realizados en población amerindia como los Mayas y Cayapas, y en grupos nativos americanos. Lo anterior sugiere que el alelo  $\epsilon 2$  estuvo ausente en los seres humanos del norte de Asia que se asentaron en el ártico y poblaron el continente americano<sup>20</sup>.

La Tabla número 3 muestra la distribución de los genotipos del gen ApoE en las mismas poblaciones que se muestran en la tabla 2. En general el genotipo más frecuente fue el  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , el cual predominó en población Colombiana<sup>5, 23</sup>, indígenas mexicanos<sup>20</sup>, China y Japón<sup>29-30</sup> y en menor proporción en africanos nigerianos. Por su parte, los genotipos menos frecuentes son en su orden los

homocigotos para  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 4$ , los cuales no fueron reportados en Colombia ni en los indígenas Mazatecos de México.

**TABLA No. 2 Frecuencias relativas de los alelos del gen apoE en diferentes poblaciones.**

POBLACIÓN ESTUDIADA	TAMAÑO DE LA MUESTRA	FRECUENCIA RELATIVA		
		$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
Afroamericanos <sup>19</sup>	1612	0,131	0,668	0,201
Amerindios <sup>20</sup>	95	0,000	0,816	0,184
Indígenas mexicanos <sup>21</sup>	75	0,000	0,900	0,100
Caucásicos (Framingham) <sup>22</sup>	2258	0,077	0,789	0,133
Bogotá Colombia <sup>5</sup>	200	0,050	0,870	0,080
Quindío Colombia <sup>23</sup>	500	0,053	0,916	0,031
Africanos (Nigeria) <sup>24</sup>	176	0,028	0,662	0,310
Alemania <sup>25</sup>	1557	0,082	0,782	0,136
Finlandia <sup>26</sup>	1577	0,039	0,767	0,194
Francia <sup>27</sup>	504	0,081	0,802	0,117
Italia <sup>28</sup>	260	0,073	0,827	0,100
China <sup>29</sup>	141	0,074	0,844	0,082
Japón <sup>30</sup>	576	0,037	0,846	0,117



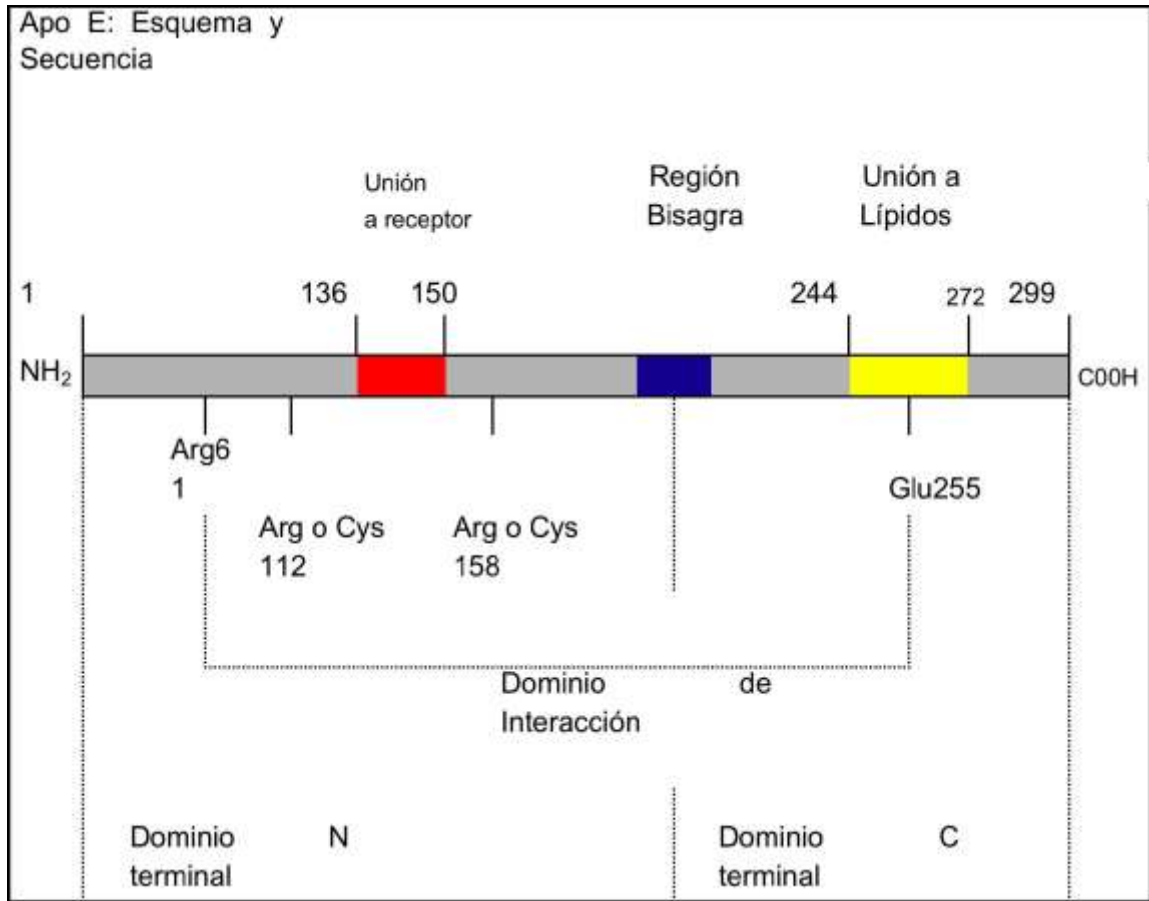
**TABLA No. 3 Frecuencias porcentuales de los genotipos del gen ApoE en diferentes poblaciones.**

POBLACIÓN ESTUDIADA	TAMAÑO DE LA MUESTRA	FRECUENCIA DE LOS GENOTIPOS (%)					
		ε2/ε2	ε3/ε2	ε3/ε3	ε4/ε2	ε4/ε3	ε4/ε4
Afroamericanos <sup>19</sup>	1612	2	18	43	6	28	3
Indígenas mexicanos <sup>21</sup>	75	0	0	81	0	19	0
Caucásicos (Framingham) <sup>22</sup>	2258	0,62	13,1	62	1,6	18,8	3
Bogotá Colombia <sup>5</sup>	200	0	8,2	77,1	0,8	12,3	0
Quindío Colombia <sup>23</sup>	500	0	5,6	90,8	0,2	3,2	0
Africanos (Nigeria) <sup>24</sup>	176	0	3	46	3	37	11
Alemania <sup>25</sup>	1557	0,9	11,7	62,2	2,9	20	2,2
Finlandia <sup>26</sup>	1577	0,3	5,4	58,7	1,8	30,6	3,2
Francia <sup>27</sup>	504	0,8	13	64,2	1,6	18,6	1,58
Italia <sup>28</sup>	260	0,4	12	68,4	16,5	1,5	1,2
China <sup>29</sup>	141	1,4	12,1	70,9	0	14,9	0,7
Japón <sup>30</sup>	576	0,3	6,1	71,9	0,7	19,3	1,7

### **3.3 ESTRUCTURA DE LA APOLIPOPROTEÍNA E**

Apo E es una proteína de 34 kDa, está formada por 299 aminoácidos organizados en 2 dominios independientes: el N-terminal y el C-terminal conectados por una región bisagra que es flexible. La región que interactúa con los receptores de Apo E está en el dominio N-terminal, por ejemplo, el sitio de unión del receptor de LDL (LDL-R) se encuentra en esta región entre los aminoácidos 141 y 155. La región de unión a lípidos está en el dominio C-terminal, como se muestra en la Figura 2. Las 3 isoformas Apo E2, Apo E3 y Apo E4 difieren únicamente en las posiciones 112 y 158, pero estas diferencias afectan a la estructura de la proteína y a su unión a lípidos y a receptores. Apo E2 transporta lípidos menos eficientemente y su presencia se asocia con la hiperlipoproteinemia tipo III por poseer poca afinidad con receptores específicos en la superficie de las células hepáticas conocidos como receptores RLP, los cuales permiten depurar del plasma a los remanentes de quilomicrón (rQM) y de VLDL. Apo E4 se une preferencialmente a lipoproteínas de gran tamaño y está asociada con un moderado aumento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular.

**FIGURA 2. Estructura de la apolipoproteína E.**



### 3.4 FUNCIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E Y SU RELACIÓN CON DISLIPIDEMIAS

#### 3.4.1 DISLIPIDEMIA:

El diagnóstico de dislipidemia se define como la alteración de los niveles de los lípidos sanguíneos. De acuerdo con las guías del Adult Treatment Panel III (ATP III), se consideran “altos” los niveles de colesterol total  $\geq 240$  mg/dL, de

colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL)  $\geq 160$  mg/dL y de triglicéridos  $\geq 200$  mg/dL; y “bajos” los niveles séricos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL)  $\leq 40$ mg/dL<sup>33</sup>.

Las dislipidemias se clasifican en<sup>34</sup>:

HIPERCOLESTEROLEMIA AISLADA: aumento de cLDL

HIPERTRIGLICERIDEMIA AISLADA: aumento de Triglicéridos

HIPERLIPIDEMIA COMBINADA: aumento de cLDL y Triglicéridos

cHDL BAJO.

HIPERLIPIDEMIA MÁS cHDL BAJO: Hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia más cHDL bajo.

**3.4.1.1 HIPERCOLESTEROLEMIA AISLADA:** se caracteriza por presentar niveles de colesterol LDL aumentados en plasma. Puede expresarse como consecuencia de trastornos genéticos dentro de los que se destacan la hipercolesterolemia familiar y la poligénica; y/o por la exposición a ciertos factores medioambientales, tales como una dieta aterogénica y el uso de anabólicos androgénicos y progestágenos.

**Hipercolesterolemia Familiar:** es una enfermedad autosómica dominante debida a una mutación en el receptor de las lipoproteínas LDL. En su forma heterocigota presenta una prevalencia de un afectado por cada 500 personas, y se relaciona con cifras de colesterol total en un intervalo de 300 a 600 mg/dL, xantomas tendinosos y cardiopatía isquémica entre los 20 y los 50 años. Por su

parte, los homocigotos de esta enfermedad son raros (1:1000000 en la población), pero pueden tener concentraciones de colesterol total tan elevadas como 800 a 1000 mg/dL. Estos pacientes con frecuencia tienen su primer infarto cardiaco cuando aún están en la adolescencia<sup>14</sup>.

Los xantomas tendinosos son pequeñas tumoraciones grasas con un diámetro que varían entre unos pocos milímetros hasta máximo 7,5 cm. Se localizan en ligamentos, fascias o tendones; específicamente en los tendones extensores de las manos y de los pies<sup>35</sup>.

Los pacientes con hipercolesterolemia homocigota pueden presentar también xantomas planos intertriginosos, los cuales consisten en placas ligeramente elevadas con diámetros hasta de 5 cm, que aparecen en espacios interdigitales, axilas y fosas anticubitales<sup>35</sup>.

**Hipercolesterolemia Poligénica:** Es la causa genética más frecuente. Entre el 10 y el 20% de los sujetos con hipercolesterolemia tienen familiares con esta anomalía. A la fecha no se conoce el número de genes que pueden estar implicados. Estos pacientes suelen mejorar cuando consumen dietas hipolipemiantes<sup>36</sup>.

Por otro lado, los factores medioambientales, como el consumo de dietas aterogénicas, es decir, ricas en colesterol, grasas saturadas y ácidos grasos trans, inducen en sujetos susceptibles el desarrollo de una hipercolesterolemia aislada leve a moderada. Esta susceptibilidad puede deberse a una hipercolesterolemia poligénica, o a fenotipos de Apo  $\epsilon$ 4, principalmente porque

Apo E en conjunto con la Apo B sirve como ligando para el receptor Apo B/E presente en la mayoría de las membranas celulares que permite que la Lipoproteína de baja densidad o LDL entregue colesterol a las células periféricas<sup>2</sup>

El mecanismo implicado en la influencia que ejercen los anabólicos androgénicos y los progestágenos en el desarrollo de una hipercolesterolemia aislada, aún no se ha esclarecido.

**3.4.1.2 HIPERTRIGLICERIDEMIA AISLADA:** en las guías del Adult Treatment Panel III (ATP III) se han definido las concentraciones límites altas de triglicéridos entre 150 y 200 mg/dL, altas entre 200 y 500 mg/dL y muy altas cuando son mayores de 500 mg/dL<sup>33</sup>.

En esta categoría los pacientes presentan triglicéridos mayor de 150 mg/dL y colesterol total menor de 200 mg/dL. Sin embargo, cuando los triglicéridos superan los 1000 mg/dL las concentraciones de colesterol total pueden superar los 200 mg/dL sin sobrepasar la quinta parte de los triglicéridos<sup>37</sup>.

La hipertrigliceridemia se debe a un aumento de la síntesis hepática de la VLDL, asociado por lo general a un exceso de grasa visceral y/o a un defecto en la depuración de esta lipoproteína por insuficiencia de lipoproteínlipasa, que puede ser por causa genética o adquirida<sup>38</sup>.

Otro defecto genético implicado en la hipertrigliceridemia aislada es el déficit familiar de apo CII, el cual se manifiesta siempre con aumento grave de triglicéridos, lo que le otorga al paciente un riesgo de pancreatitis aguda<sup>38</sup>. Estas

hipertrigliceridemias extremas pueden causar múltiples síntomas inespecíficos: disnea, mareo, malestar general, dolor abdominal, parestesias y esteatosis hepática. Cuando la concentración de triglicéridos sobrepasa los 1000 mg/dL pueden aparecer los xantomas eruptivos generalmente en sitios de apoyo como codos, espalda y glúteos; hepatoesplenomegalia, y adenomegalia cuando se superan los 4000 mg/dL<sup>37</sup>.

Por otro lado, también se han descrito hipertrigliceridemias secundarias a ciertas entidades clínicas como insuficiencia renal, síndrome nefrótico, obesidad, diabetes y alcoholismo; y al tratamiento a ciertos fármacos como son estrógenos, diuréticos, betabloqueadores, corticoides, tamoxifeno, retinoides, interferón e inhibidores de las proteasas en el sida<sup>38</sup>.

**3.4.1.3 HIPERLIPIDEMIA COMBINADA:** Las hiperlipidemias mixtas son aquellas en las cuales se produce un aumento de colesterol y triglicéridos. Entre ellas, las que tienen un elevado componente genético son la hiperlipidemia familiar combinada y la hiperlipoproteinemia tipo III.

**Hiperlipidemia Familiar Combinada (HLFC):** La hiperlipidemia familiar combinada (HLFC) es la forma más común de las dislipidemias de origen genético, con una prevalencia de 0.5% a 2% en la población general y de 14% entre los sujetos con enfermedad cardiovascular prematura<sup>39</sup>. Tiene un patrón de herencia autosómica dominante. Diversos estudios han demostrado que algunos genes involucrados en el metabolismo de los lípidos contribuyen en la aparición de HLFC. Ejemplos de estos son el complejo de los genes de las

apolipoproteínas A-I/C-III/A-IV<sup>40-41</sup>, el gen de la lipasa lipoproteica (LPL)<sup>42-43</sup>, el gen de la lipasa hepática (LH)<sup>44-45</sup>, el gen de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP)<sup>46</sup> el gen de la lecitin colesterol acil transferasa (LCAT)<sup>46-47</sup>, y el gen del receptor 1B del factor de necrosis tumoral (TNFRSF1B)<sup>48</sup>. Sin embargo, ninguno de estos genes tiene un papel predominante en el desarrollo del fenotipo. Se sugiere que mutaciones en estos genes pueden aportar riesgo genético, pero no son suficientes para producir la enfermedad.

El mecanismo patogénico predominante en la HLFC es un aumento en la producción de VLDL por el hígado acompañado de alteraciones en el catabolismo de partículas ricas en triglicéridos tanto de origen endógeno (VLDL e IDL), como exógeno (remanentes de quilomicrones). La síntesis aumentada de apo B, y de ésteres de colesterol podría ser consecuencia de la producción aumentada de triglicéridos. El aumento de VLDL condiciona un aumento de su transformación a LDL. La sobreproducción de triglicéridos por parte del hígado lleva a una acumulación de los mismos en las VLDL y a un mayor intercambio desde las VLDL hasta las HDL y LDL por la acción de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). Este enriquecimiento en triglicéridos favorece su catabolismo por la acción de la lipasa hepática (LH), lo que causa descensos en la concentración de HDL y la aparición de LDL densas y pequeñas con capacidad aterogénica.

**Hiperlipoproteinemia Tipo III:** Tiene una incidencia de 3 a 5 por cada 1000



individuos. Su mecanismo patogénico se relaciona con un déficit de apo E, o a la presencia del polimorfismo  $\epsilon 2/\epsilon 2$ , el cual da origen a una proteína con poca afinidad con los receptores hepáticos conllevando a un defecto en la captación de remanentes de Quilomicrones y VLDL; los cuales se acumulan en plasma<sup>49</sup>. El defecto genético se expresa clínicamente en menos del 10% de los casos, debido a que requiere de una asociación con otra alteración del metabolismo de los lípidos que disminuya el número o la función de los receptores de LDL, debido a que los remanentes también pueden ser depurados por la unión de su apoproteína B con este receptor. Entre las causas más frecuentes se encuentran la obesidad, la diabetes mellitus, el hipotiroidismo y el empleo de algunos fármacos como los betabloqueadores y los diuréticos<sup>37</sup>. Se caracteriza por niveles plasmáticos elevados de triglicéridos y colesterol total, xantomas y enfermedad cardiovascular prematura.

**3.4.1.4 HDL BAJO AISLADO:** En esta categoría se incluyen los individuos con cHDL por debajo de 40 mg/dL. En la mayoría de los casos se relaciona con etiologías secundarias como el tabaquismo, la obesidad central con resistencia a la insulina, el ejercicio anaeróbico, el consumo de algunos medicamentos como andrógenos, progestágenos, probucol, corticoides, betabloqueadores y diuréticos; enfermedades como neoplasias malignas diseminadas y las hepatopatías<sup>37</sup>.

Las causas genéticas se presentan con menor frecuencia. Entre ellas se destacan un defecto en la síntesis de apo AI, y la deficiencia de Lecitin

Colesterol Acil Transferasa (LCAT). Esta última se asocia con cifras de cHDL menores de 25 mg/dL y cambios en la morfología de los eritrocitos<sup>37</sup>.

La hipoalfalipoproteinemia familiar y la enfermedad de Tangler cursan con niveles de cHDL por debajo de 20 mg/dL y ausencia de esta lipoproteína respectivamente. Estas alteraciones resultan de mutaciones en el gen que codifica al transportador ABCA1, cuya deficiencia parcial o ausencia total da lugar a un aumento extremo de colesterol debido a su participación en la síntesis de HDL. El acúmulo de colesterol induce una aterosclerosis precoz, alteración de la estructura y función valvular con gravedad y repercusiones clínicas variables<sup>50</sup>.

**3.4.1.5 HIPERLIPIDEMIA (HIPERTRIGLICERIDEMIA Y/O HIPERCOLESTEROLEMIA) MÁS cHDL BAJO.** En esta alteración coexisten aumento de triglicéridos y/o de colesterol total al mismo tiempo que se presentan bajas concentraciones de HDL.

### **3.4.2 PARTICIPACIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN LA HOMEOSTASIS LIPÍDICA**

Luego de ser absorbidos los Triglicéridos exógenos en la mucosa intestinal, son ensamblados en los QM que pasan a través del conducto torácico a la circulación periférica.

Una vez en circulación, los Quilomicrones (QM) adquieren más apolipoproteínas, principalmente apo E y varios tipos de Apo C.

La Apo CII activa a la Lipoproteínlipasa (LPL), la cual se encargará de hidrolizar a los Triglicéridos contenidos en los QM. La lipoproteína resultante ahora es más pequeña y densa, por haber perdido su contenido de Triglicéridos y recibe el nombre de remanente de Quilomicrón (rQM), los cuales son captados con rapidez por el hígado por la interacción de Apo E con los receptores RLP. Teniendo entonces que, en circunstancias normales, los QM y sus remanentes son de corta duración en circulación, desapareciendo antes de 12 horas de ayuno (Figura 3).

Igualmente, los Triglicéridos de origen endógeno son transportados por la VLDL, los cuales en circulación son hidrolizados por la LPL a ácidos grasos libres y glicerol, convirtiéndose en remanente de VLDL o Lipoproteína de densidad intermedia (IDL). Algunas de estas partículas remanentes son captadas por el hígado gracias a la interacción de la Apo E con los receptores de la célula hepática (RLP). Mientras que otras se convierten por lipólisis en Lipoproteína de baja densidad (LDL.)<sup>14, 51</sup> (Figura 4).

Por su parte, las LDL son las lipoproteínas encargadas de entregar colesterol a las células periféricas gracias a un receptor específico de LDL presentes en la mayoría de las membranas celulares, el cual reconoce a la Apo B-100 y Apo E (Apo B/E) de esta lipoproteína.

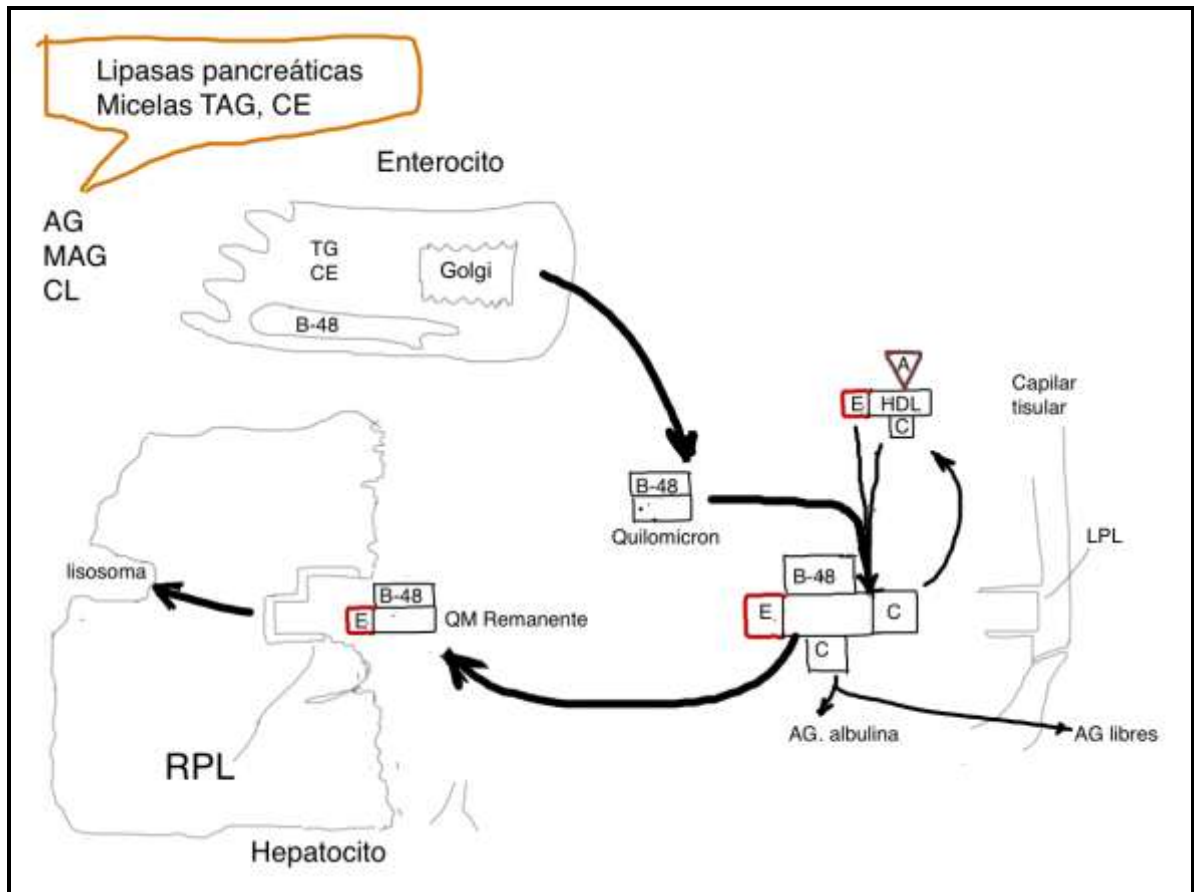
Una vez enlazada la LDL con el receptor, es endocitada y transportada al lisosoma, donde es degradada para aprovechar los lípidos que transporta, con

la ayuda de enzimas como: Lipasa ácida y Acil-Colesterol-Aciltransferasa<sup>51</sup> (Figura 4).

Por otro lado, la HDL tiene la función de aceptar el colesterol de los tejidos, el cual será convertido a éster de colesterilo por acción de la Lecitin-Colesterol-Aciltransferasa (LCAT) que reside en la HDL.

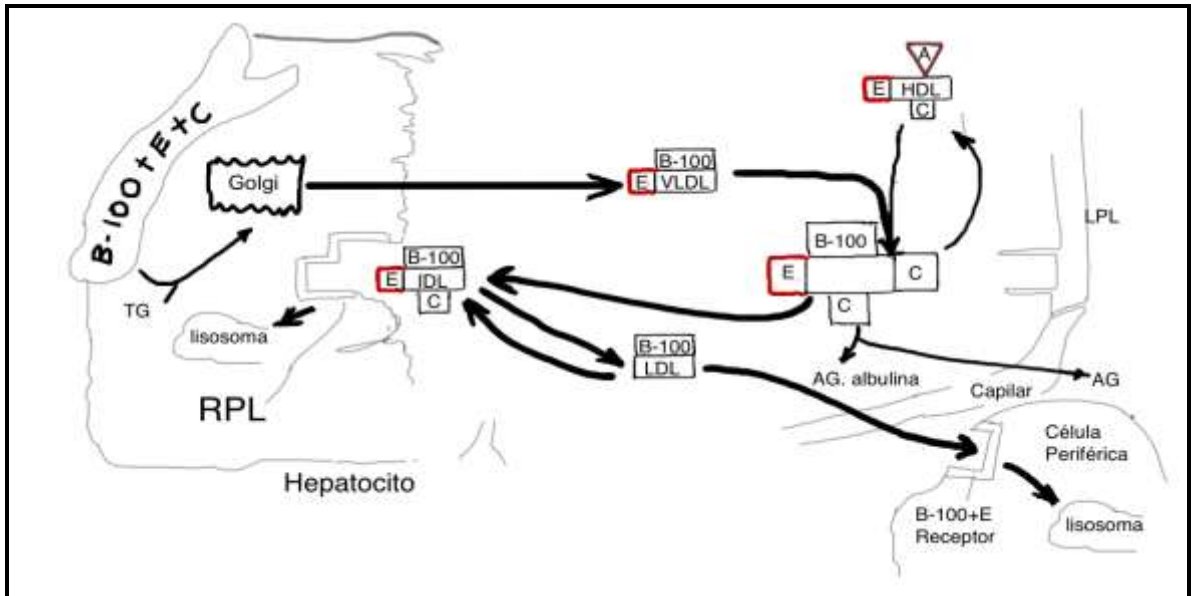
La HDL puede entonces entregar el Colesterol al hígado de manera directa por el receptor SR-BI y posiblemente por otros receptores. Alrededor de la mitad del colesterol en la HDL es regresado al hígado por el receptor de LDL (Apo B/E), después de ser transferido primero de HDL a LDL por la proteína de transferencia de éster de colesterilo (CETP)<sup>8</sup>

**FIGURA 3. Participación de la apolipoproteína E en la depuración plasmática de remanente de Quilomicrón.**



Quilomicrón recibe Apo E y C desde HDL. Gracias a la Apo C recibida LPL es activada para hidrolizar a los Triglicéridos, dando como resultado al remanente de Quilomicrón, que a través de Apo E se une a los receptores Hepáticos RPL para ser depurado del plasma.

**FIGURA 4. Participación de la apolipoproteína E en la depuración plasmática de IDL y LDL.**



VLDL entrega los triglicéridos hidrolizados por LPL al tejido adiposo o a las células que lo requieran y se convierte en IDL (o remanente de VLDL) quien gracias a su Apo E interactúa con el receptor hepático RLP para su depuración del plasma. Así mismo Apo E y Apo B de LDL interactúan con el receptor celular de LDL o receptor Apo B/E para entregar el colesterol y ser depurado del plasma.

### 3.4.3 POLIMORFISMOS DE APOE Y DISLIPIDEMIA

Apo E juega un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas, en especial de aquellas ricas en triglicéridos. Como ya se ha mencionado, es un ligando para el receptor de LDL o receptor Apo B/E y para el receptor lipoproteico LRP<sup>14, 51</sup>.

Diversos estudios poblacionales, han mostrado la relación entre el polimorfismo del gen ApoE y los estados de dislipidemias. Para comparar el riesgo de padecerlas, el polimorfismo homocigoto  $\epsilon 3/\epsilon 3$  se usa como referente. En

general, en individuos con el alelo  $\epsilon 2$  los niveles de colesterol total disminuyen y en aquellos con alelo  $\epsilon 4$  aumentan. En este sentido, el colesterol total se reduce 3,2 veces más en pacientes con  $\epsilon 2$  al compararlos con pacientes portadores de  $\epsilon 4$ . En promedio, si se compara el colesterol total de los individuos con alelo  $\epsilon 3$  con el colesterol total de los que poseen  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 4$ , éste, es aproximadamente 14 mg/dL más bajo en individuos con  $\epsilon 2$  y 8 mg/dL más elevado en aquellos con  $\epsilon 4$ <sup>52</sup>. El mismo efecto se ha podido demostrar en niños<sup>53-54</sup>, y es evidente en la mayoría de las poblaciones a pesar de los variados promedios de las concentraciones de colesterol Total.

Son muchos los estudios<sup>5, 6, 32, 55-59</sup> que han concluido que el alelo  $\epsilon 4$  está relacionado con cifras elevadas de colesterol total, cLDL y bajos niveles de cHDL, lo cual constituye un importante factor de riesgo cardiovascular. En Corea este alelo presentó un efecto significativo sobre las alteraciones lipídicas ya mencionadas cuando se comparó con el alelo  $\epsilon 2$ <sup>56</sup>.

En concordancia, investigaciones en Colombia tanto en niños como en adultos reportan una influencia del polimorfismo del gen ApoE en el incremento de los lípidos. Sin importar la edad de los participantes en estos estudios, los autores demostraron que el alelo  $\epsilon 4$  y genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  se asociaron con cifras más elevadas de colesterol total<sup>5, 23</sup>.

Hallazgos similares encontraron Al-Yahyaee, Ganguly, Alkindi y Al-Bahrani, quienes adicionalmente informaron que el alelo  $\epsilon 4$  estuvo presente en el 31% de los individuos con enfermedad coronaria y que el alelo  $\epsilon 3$  en el 26% de

ellos. Observaron también que aquellos individuos con alelo  $\epsilon 4$  tenían un riesgo 1,3 veces mayor para desarrollar enfermedad arterial coronaria<sup>6</sup>. Por su parte, Wilson, Schaefer, Larson y Ordovas realizaron un metaanálisis con 14 estudios observacionales con el fin de evaluar el impacto de los polimorfismos del gen ApoE en la enfermedad coronaria. Los investigadores concluyeron que en comparación con el alelo  $\epsilon 3$ , el alelo  $\epsilon 4$  se asoció con mayores probabilidades de enfermedad cardíaca tanto en hombres como en mujeres<sup>55</sup>.

Otras investigaciones han logrado demostrar que el alelo  $\epsilon 2$  se asocia a un efecto antiaterogénico, aunque en algunos casos se relaciona con hipertrigliceridemia<sup>5, 6, 32, 55-59, 60-64</sup>. Es así como se ha reportado que individuos con alelo  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  presentan dos y tres veces más riesgo de desarrollar dislipidemia con respecto a los portadores del alelo  $\epsilon 2$ <sup>59</sup>.

Al respecto en Colombia se reportó que en niños el alelo con efecto protector fue  $\epsilon 2$ , sin embargo en las niñas este alelo se asoció con aumento de triglicéridos y VLDL<sup>23</sup>, mientras que en adultos bogotanos los niveles plasmáticos de triglicéridos fueron significativamente más elevados en sujetos con genotipos  $\epsilon 3/\epsilon 4$  al compararlos con aquellos portadores de  $\epsilon 3/\epsilon 2$ <sup>5</sup>.

Otros estudios adicionalmente han asociado el polimorfismo del gen ApoE con los diferentes tipos de dislipidemias, y coincidiendo con los datos anteriores, el alelo Apo  $\epsilon 4$  se relaciona en la mayoría de los casos con hipercolesterolemia familiar y con hiperlipidemia familiar combinada (HLFC)<sup>55, 60-63</sup>; y el alelo Apo  $\epsilon 2$  con hipertrigliceridemia familiar y disbetalipoproteinemia familiar o también



conocida como hiperlipoproteinemia tipo III, cuyo nombre es un vestigio del sistema de clasificación desarrollado por Fredrickson y colaboradores<sup>65</sup>.

La hiperlipoproteinemia tipo III o disbetalipoproteinemia familiar se caracteriza por niveles plasmáticos elevados de triglicéridos y colesterol total, xantomas y enfermedad cardiovascular prematura. Los defectos moleculares que predisponen al desarrollo de esta enfermedad son: defecto estructural y/o funcional de la apolipoproteína E, o un defecto funcional en el sistema de receptores RLP del hígado<sup>64</sup>. La mayoría de los pacientes con hiperlipoproteinemia tipo III tienen un defecto estructural relacionado principalmente con el alelo polimórfico  $\epsilon$ 2, el cual se traduce en una proteína con poca afinidad con los receptores RLP del hígado. Esto conlleva a un retraso en el catabolismo de remanentes de quilomicrones e IDL, y al desarrollo de anomalías lipídicas característicos de esta enfermedad.

Las dislipidemias mencionadas, se relacionan en la mayoría de los casos con enfermedad cardiovascular. Investigadores han analizado las alteraciones de los grandes vasos en individuos en etapa post-mortem, teniendo en cuenta el resultado de angiografías y ultrasonido arterial, y su relación con el polimorfismo genético de ApoE.

En un estudio en el que se analizaron las autopsias de jóvenes caucásicos y afroamericanos de 15 a 34 años de edad, se reportó que el genotipo de ApoE representó el 5,75% de la variación observada en las lesiones de la aorta en los caucásicos, y un 5,9% en los afroamericanos<sup>66</sup>. Por su parte, LIVESKOSKI y

colaboradores, al estudiar las arterias coronarias en 700 autopsias de muertes súbitas en individuos de género masculino con edades comprendidas entre los 33 y 70 años, concluyeron que el alelo  $\epsilon 4$  es un factor significativo de riesgo genético para la arterioesclerosis coronaria en edad temprana<sup>67</sup>. Igualmente se ha reportado que el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 2$  se asocia con arterioesclerosis carotídea, lo cual se atribuye posiblemente al retraso en el aclaramiento de lipoproteínas ricas en triglicéridos, debido a que  $\epsilon 2$  tiene poca afinidad con los receptores LRP<sup>68</sup>.

El denominado "The MONICA STUDY", es un estudio multinacional patrocinado por la OMS, y sugiere que un aumento de 0,01 en la frecuencia alélica de  $\epsilon 4$  aumenta la tasa de muerte por enfermedad coronaria a 24 por cada 100.000 individuos<sup>69</sup>. Los autores de este estudio también sugieren que la distribución geográfica de los alelos de ApoE puede ser utilizada para predecir la variación interpoblacional en las tasas de mortalidad por enfermedad coronaria.

Finlandia, Dinamarca y Omán también se ha estudiado la relación del polimorfismo del gen ApoE con el desarrollo de enfermedad cardiovascular<sup>6, 70-71</sup>. Algunos de estos estudios permiten concluir que en comparación con sujetos que poseen el alelo  $\epsilon 3$ , aquellos con  $\epsilon 4$  tienen un riesgo 1,3 veces mayor de sufrir enfermedad cardiovascular; y todos coinciden en que el alelo Apo  $\epsilon 2$  pudiera tener un efecto antiaterogénico importante. Sin embargo, en Colombia al establecer la asociación entre grados de obstrucción coronaria y el polimorfismo del gen ApoE, se obtuvo que fue significativa únicamente para el

género masculino. En este estudio el genotipo  $\epsilon 4/\epsilon 4$  y  $\epsilon 2/\epsilon 2$  no se encontraron asociados con presencia de placa aterosclerótica<sup>71</sup>.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 GENERAL**

Determinar la distribución de los diferentes polimorfismos del gen ApoE en una muestra de pacientes con dislipidemia de la ciudad de Valledupar.

### **4.2 ESPECÍFICOS**

- Calcular la frecuencia alélica y genotípica del gen ApoE en pacientes con dislipidemia de la ciudad de Valledupar.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas del gen ApoE encontrados en la muestra con poblaciones relacionadas.
- Correlacionar los alelos y genotipos del gen ApoE, con el riesgo de padecer los diferentes tipos de dislipidemia.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

**5.1 TIPO DE ESTUDIO:** Se trata de un estudio descriptivo, transversal.

### **5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTRA:**

Se analizaron las muestras de pacientes con dislipidemia que pertenecen al Programa de Promoción y Prevención de hipertensión del Hospital Eduardo Arredondo Daza (HEAD) de la ciudad de Valledupar.

Los pacientes analizados cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

Ser hombre o mujer mayor de 18 años

Pertenecer al Programa de Control de hipertensión del HEAD, el cual hace parte del Programa de Promoción y Prevención de enfermedades de esta institución.

Tener diagnóstico de dislipidemia por el laboratorio y clasificación por médico internista.

Ser residente de la ciudad de Valledupar

Haber conocido, aceptado y firmado el consentimiento informado para formar parte del estudio.

El diagnóstico de dislipidemia por el laboratorio clínico se define como la alteración de los niveles de los lípidos sanguíneos. Para la determinación del perfil lipoproteico se obtuvieron muestras de suero por venopunción convencional, previo ayuno mayor de 8 horas. El colesterol total y los

triglicéridos se determinaron por métodos enzimáticos fotolorimétricos comerciales (Biosystems); al igual que el c-HDL previa precipitación de las demás lipoproteínas con fosfato fosfotungstico. El c-LDL se calculó empleando la ecuación de Friedewald<sup>10</sup> en aquellos pacientes que tenían Triglicéridos inferiores a 400 mg/dl. Igualmente se calculó la relación Colesterol Total/cHDL. El control de calidad interno se efectuó con sueros controles nivel I y nivel II (Biosystems) para garantizar la veracidad de los resultados.

De acuerdo con las guías del Adult Treatment Panel III (ATP III), se consideran “altos” los niveles de colesterol total  $\geq 240$  mg/dL, de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL)  $\geq 160$  mg/L y de triglicéridos  $\geq 200$  mg/dL,; y “bajos” los niveles séricos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL)  $\leq 40$ mg/dL<sup>33</sup>. Para la relación colesterol total/cHDL se tuvo en cuenta los siguientes valores para evaluar el riesgo:  $\geq 4,5$  para mujeres y  $\geq 5,0$  para los varones.

Los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión fueron citados para la toma de muestra para la genotipificación, momento en el cual se procedió también a registrar la siguiente información: Edad, sexo, estado civil, nivel de escolaridad, ocupación, peso, talla, índice de masa corporal (IMC). Se obtuvo muestra de sangre total por veno punción convencional, utilizando el sistema Vacutainer con tubo con EDTA. Las muestras fueron refrigeradas a 8°C y transportadas a la ciudad de Barranquilla para ser procesadas en el Laboratorio de Genética de la Universidad del Norte.

**5.3 VARIABLES DEL ESTUDIO:** Están definidas en la Tabla 4.

**TABLA 4. Caracterización de las variables del estudio**

MACROVARIABLE	VARIABLE	DEFINICIÓN	NATURALEZA	NIVEL DE MEDICIÓN	CRITERIO DE CLASIFICACIÓN
CARACTERÍSTICAS SOCIO DEMOGRÁFICAS	EDAD	Números de años cumplidos por el entrevistado a la fecha de la toma de muestra medidos a partir de la fecha de nacimiento	Cuantitativa continua	Razón	0, 1, 2, 3, 4.....
	SEXO	Características fenotípicas que diferencian al hombre de la mujer	Cualitativa	Nominal	Masculino Femenino
FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR	FRACCIONES LIPIDICAS	Concentración de lípidos en la sangre	Cuantitativa	Razón	0, 1, 2.... 100, 200 mg/dL
	MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS	Índice de masa corporal	Cuantitativa	Razón	0, 1, 2, 3, 4..... Kg/ cm2
	POLIMORFISMO DEL GEN APO E	Alelos (ε2, ε3 y ε4) y Genotipos del gen Apo E (seis combinaciones posibles de los alelos mencionados)	Cualitativa	Nominal	Presente o Ausente

## 5.4 METODOLOGÍA

### GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN APOE

**EXTRACCIÓN DEL ADN:** Se obtuvo el ADN utilizando el kit comercial UltraClean™ Blood DNA Isolation Kit (Non-Spin) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**AMPLIFICACIÓN DE LOS ALELOS DEL GEN APOE MEDIANTE PCR:** Para la identificación de los diferentes alelos del gen ApoE, se procedió a amplificar una región del exón 4, el cual contiene los sitios polimórficos 112 y 158, en los que se presentan las sustituciones de los nucleótidos que dan origen a los diferentes polimorfismos del gen ApoE.

Los primers específicos para el gen ApoE que se utilizaron fueron los descritos por Hixon y Vernier<sup>72</sup>.

Forward F4 5´.-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3´.

Reverse F6 5´.-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3´.

Con estos primers se obtuvo un producto amplificado de 244 pb aproximadamente.

**MEZCLA DE REACCIÓN PARA PCR:** La mezcla de reacción incluyó un volumen final de 25ul:

ADN genómico (30-100 ng)

dNTPs 0.18 mM

Buffer PCR 1X (20mM TRis- HCl ph 8.4, 50 mM KCl)

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM



Primers 12,5 pmoles

Taq polimerasa: 0,5 unidades (Bioline)

Agua destilada

Se realizó la amplificación en el equipo ICycler, BioRad, con una Desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, y 30 ciclos con las siguientes condiciones:

Desnaturalización: 95°C por 1 minuto

Hibridación: 60°C por 1 minuto

Extensión: 70°C por 1 minuto

Y una elongación final a 70°C por 2 minutos.

Luego se procedió a realizar corridos electroforéticos en gel de agarosa al 1.5% para la confirmación de la amplificación del gen, utilizándose un marcador de peso molecular Promega (100 bp DNA Step ladder).

Como control negativo se utilizó una mezcla de reacción que no incluía muestra. En caso de que esta reacción mostrara resultados positivos se entendía que había contaminación con otros productos de amplificación.

**DIGESTIÓN ENZIMÁTICA:** se utilizaron 5 Unidades de la endonucleasa de restricción HhaI (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA), a 37°C por 3 a 16 horas.

A continuación se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% por 5 horas a 150 voltios hasta obtener un corrido de 9 cm, utilizándose el marcador de peso molecular de Promega (25bp DNA Step Ladder), con el fin de separar los diferentes fragmentos generados por esta digestión enzimática (Tabla 5).

**TABLA 5. Fragmentos obtenidos post-digestión con la enzima de restricción HhaI.**

GENOTIPO	FRAGMENTOS
(E2/E2)	91 y 83 pb
(E2/E3)	91, 83, y 48 pb
(E3/E3)	91 y 48 pb
(E3/E4)	91,72, y 48 pb
(E2/E4)	91, 83, 72, y 48 pb
(E4/E4)	72 y 48 pb

La coloración del gel para la visualización del corrido se realizó con bromuro de etidio, observándose y fotografiándose a 302 nm UV (Anexo 1).

**MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS:** Se obtuvo el dato de peso corporal con una balanza electrónica en Kg. La estatura se midió con un tallímetro y se registró en cm. El sobrepeso y obesidad se determinaron según índice de masa corporal (Kg/cm<sup>2</sup>). Se tuvieron en cuenta los puntos de corte para adultos de la Organización Mundial de la salud. (WHO (2000) Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic, Report of a WHO Consultation on Obesity.) (Tabla 6).

**TABLA 6. Puntos de corte del IMC para adultos según la Organización Mundial de la salud.**

FUENTE	BAJO PESO	NORMAL	SOBREPESO	OBESIDAD		
				GRADO I	GRADO II	GRADO III
OMS	<18.5	18.5 - 24.9	25.0-29.9	30.0 - 34.9	35.0 - 39.9	> 40.0

El IMC saludable se puede definir en el ámbito clínico entre 20 y 25 unidades en hombres y entre 19 a 24 en mujeres.

### **5.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN:**

La estimación de las frecuencias alélicas se realizó mediante conteo alélico. La prueba de chi cuadrado se utilizó para comprobar si las frecuencias alélicas observadas estaban de acuerdo con las esperadas según la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg. Se compararon los niveles de lípidos en sangre y demás variables clínicas con los genotipos y alelos del gen ApoE utilizando el análisis de varianza ANOVA. Así mismo se calcularon las prevalencias para cada dislipidemia según los alelos y genotipos de ApoE y se establecieron las diferencias estadísticas entre las prevalencias mediante la prueba de chi cuadrado. Finalmente se estableció la asociación entre los alelos y genotipos del gen ApoE y los diferentes tipos de Dislipidemias calculando el odds ratio (OR) con un Intervalo de Confianza del 95%. El valor de significancia estadística se estableció a partir de  $p < 0,05$ . Para esto se empleó el software estadístico SPSS versión 17.0

## **5.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Este estudio fue presentado ante el Comité de Ética en Investigación en el Área de la Salud de la Fundación Universidad del Norte de Barranquilla, quién emitió su aprobación en comité efectuado el 2 de Diciembre de 2010, la cual está legalizada según acta número 60.

## 6. RESULTADOS

Se evaluaron 100 pacientes, el 72% mujeres y el 28% varones, con una edad promedio de  $53,5 \pm 15$  años. El 64% de los individuos estudiados tenían menos de 60 años (Tabla 7). El perfil de lipoproteínas y el IMC según sexo se muestran en la Tabla 8.

Las frecuencias relativas de los alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  fueron 0,055, 0,48 y 0,465 respectivamente. Estas frecuencias están de acuerdo con las frecuencias esperadas según la ley de Hardy-Weinberg ( $p=0,4149$ ). El genotipo más frecuente fue el  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (72%), seguido por  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (17%),  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (7%) y  $\epsilon 2/\epsilon 4$  (4%), los genotipos  $\epsilon 2/\epsilon 2$  y  $\epsilon 4/\epsilon 4$  no fueron encontrados en la población estudiada.

La dislipidemia más frecuente fue la presencia de Hiperlipidemia (Hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia) más cHDL bajo (39%), seguida por Hipertrigliceridemia aislada (31%), Hipercolesterolemia aislada (21%), Hiperlipidemia combinada (8%) y cHDL bajo aislado (1%).

**Tabla 7. Distribución de los pacientes dislipidémicos del programa de promoción y prevención de Hipertensión arterial del Hospital Eduardo Arredondo Daza de Valledupar según edad y sexo.**

CARACTERÍSTICA	FRECUENCIA	PORCENTAJE %	PORCENTAJE ACUMULADO
<b>Sexo</b>			
Femenino	72	72	72
Masculino	28	28	100
<b>Rango de edad (Años)</b>			
20-29	6	6	6
30-39	16	16	22
40-49	16	16	38
50-59	26	26	64
60-69	19	19	83
70-79	12	12	95
80-89	5	5	100

Fuente: Encuestas

**TABLA 8. Perfil de lipoproteínas e IMC de la población en estudio.**

Variables	Masculino n= 28	Femenino n= 72	Valor de p.
	Promedio ± D.S	Promedio ± D.S	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,54 ± 3,99	26,38 ± 4,07	0,021
CT (mg/dL)	263 ± 61	248 ± 47	0,496
cLDL (mg/dL)	184 ± 72	166 ± 59	0,317
cHDL (mg/dL)	38 ± 9	41 ± 7	0,084
TAG (mg/dL)	246 ± 166	204 ± 95	0,622
Relación CT/cHDL	7,5 ± 2,7	6,3 ± 2,2	0,547

CT: Colesterol Total, TAG: Triglicéridos, cHDL y cLDL: lipoproteínas de alta y baja densidad respectivamente, IMC: Índice de Masa Corporal. Valor de (p) calculado con ANOVA.

Mediante el análisis estadístico con el programa SPSS, se estudió la relación del polimorfismo ApoE, y el comportamiento de los diferentes tipos de dislipidemias encontrados en la población de estudio. En este sentido, el efecto del polimorfismo del gen ApoE se analizó teniendo en cuenta la prevalencia de los diferentes tipos de dislipidemias (Tabla 9). De acuerdo con estudio, se observó que en los pacientes con alelo  $\epsilon 2$  la hiperlipidemia más frecuente fue la Hipertrigliceridemia aislada (54,5%), y en los individuos con alelos  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  predominó la Hiperlipidemia (en este caso hipercolesterolemia) más cHDL bajo (34,5 y 41,9% respectivamente) ( $p > 0,05$ ). Teniendo en cuenta el análisis de los genotipos, la Hipertrigliceridemia aislada fue significativamente mayor en los individuos con los genotipos que combinaba al alelo  $\epsilon 2$  ( $\epsilon 2/\epsilon 3$  y  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ), y la Hipercolesterolemia aislada predominó en aquellos con el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  ( $p < 0,05$ ). La Hiperlipidemia más cHDL bajo se presentó más en pacientes con genotipos que contienen el alelo  $\epsilon 4$ , al igual que el cHDL bajo aislado. La hiperlipidemia combinada predominó en individuos homocigotos para  $\epsilon 3$  ( $p > 0,05$ ).

**TABLA 9. Tipo de dislipidemia según alelos y genotipos del gen ApoE en la población estudiada.**

	n	Hipercolesterolemia aislada %	Hipertrigliceridemia aislada %	Hiperlipidemia Combinada %	HDL bajo %	Hiperlipidemia más HDL bajo %
<b>Alelos</b>						
ε2	11	18,2	54,5	9,1	0	18,2
ε3	96	20,4	30,2	8,3	1,1	34,5
ε4	93	21,9	20,9	7,5	1,0	41,9
Valor de p		0,944	0,3248	0,970	0,943	0,309
<b>Genotipos</b>						
ε2/ε3	7	15,3	57,1	14,3	0	0
ε3/ε3	17	28,6	5,9	17,3	0	29,4
ε3/ε4	72	47,1	33,33	5,6	1,4	44,4
ε2/ε4	4	0	50,0	0	0	50,0
Valor de p		0,000	0,001	0,075	0,853	0,006

Valor de p calculado con Chi cuadrado.

La relación Colesterol Total/colesterol HDL fue significativamente más alta en los pacientes con el alelo ε4 y el genotipo ε3/ε4, y el índice de masa corporal (ICM) fue mayor en los pacientes con genotipo ε2/ε4 ( $p < 0,05$ ). El colesterol total, cLDL, cHDL y triglicéridos no mostraron diferencias estadísticas entre los alelos y genotipos de ApoE, pero se observó que las cifras de colesterol total y cLDL fueron mayor y que el cHDL fue menor para ε4 y ε3/ε4, y que los Triglicéridos fueron mas elevados para ε2 ( $p > 0,05$ ) (Tabla 10).



**TABLA 10. Características Bioquímicas según los alelos y genotipos del gen ApoE en pacientes dislipidémicos de Valledupar.**

	n	Colesterol total (mg/dL)	cLDL (mg/dL)	cHDL (mg/dL)	TAG (mg/dL)	CT/cHDL	IMC (kg/m <sup>2</sup> )
Alelos							
ε2	11	216± 36	130± 47	45± 6	223± 68	4,9± 1,1	27,66± 5,18
ε3	96	254 ± 51	173± 63	40± 8	214± 121	6,7± 2,4	26,49± 3,88
ε4	76	255± 52	174± 63	40± 8	217± 123	6,8± 2,4	26,80± 4,10
Valor de p		0,054	0,076	0,133	0,968	0,048	0,529
Genotipos							
ε2/ε3	7	218± 36	131± 42	46± 6,3	202± 71	4,7± 0,7	25,34± 3,4
ε3/ε3	17	254± 22	179± 31	42± 4,4	165± 81	6,03± 0,6	25,65± 4,1
ε3/ε4	72	257± 56	175± 68	38± 8,5	227± 130	7,05± 2,6	26,80± 3,8
ε2/ε4	4	212± 39	126± 60	41± 5,1	258± 52	5,37± 1,7	31,71 ± 5,6
Valor de p		0,101	0,140	0,060	0,235	0,026	0,042

Los datos son reportados en promedio ± Desviación Estándar. CT: Colesterol Total, TAG: Triglicéridos, cHDL y cLDL: lipoproteínas de alta y baja densidad respectivamente, IMC: Índice de Masa Corporal. Valor de p debajo de cada columna fue calculado con ANOVA comparando las medias de cada variable clínica entre los grupos de alelos y genotipos de ApoE.

La Tabla 11 presenta los riesgos relativos que tienen los individuos de presentar algún tipo de dislipidemia según los alelos de ApoE. No hubo diferencia significativa entre los alelos estudiados. Sin embargo al analizar los riesgos de dislipidemias según los genotipos de ApoE (Tabla 12), se observa que la hipercolesterolemia aislada fue 0,2 veces más frecuente en pacientes con

$\epsilon 3/\epsilon 4$  al compararlos con individuos con  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (OR=0,20 IC=95% 0,06-0,64  $p=0,004$ ). Además que la hipertrigliceridemia aislada fue mayor en pacientes con genotipo con  $\epsilon 2$  comparada con pacientes  $\epsilon 3/\epsilon 3$ . Los genotipos con  $\epsilon 4$  ( $\epsilon 3/\epsilon 4$  y  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ) presentaron 0,8 y 0,22 veces más riesgo respectivamente para Hiperlipidemia más cHDL bajo al compararlos con  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (OR=0,85 IC=95% 0,75-0,95  $p=0,022$  para  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ) (OR=0,22 IC=95% 0,06-0,75  $p=0,039$  para  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ).

**TABLA 11. Asociación entre los alelos de ApoE y los diferentes tipos de Dislipidemias.**

	Hipercolesterolemia Aislada				Hipertrigliceridemia Aislada				Hiperlipidemia Combinada			
	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P
ε2 xε3	0,080	1,26	(0,25-6,28)	0,778	2,656	0,36	(0,10-1,27)	0,103	0,007	0,90	(0,10-8,03)	0,932
ε2 xε4	0,031	1,15	(0,23-5,79)	0,861	2,956	0,34	(0,09-1,21)	0,086	0,034	0,81	(0,09-7,31)	0,854
ε4 x ε3	0,059	0,91	(0,45-1,84)	0,808	0,031	0,94	(0,50-1,76)	0,859	0,042	0,89	(0,31-2,57)	0,838
	cHDL Bajo Aislado				Hiperlipidemia con CHDL Bajo							
	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P				
ε2 xε3	0,116	1,01	(0,99-1,03)	0,734	1,766	2,82	(0,57-13,7)	0,184				
ε2 xε4	0,199	1,01	(0,99-1,03)	0,730	2,324	3,25	(0,66-15,8)	0,127				
ε4 x ε3	0,001	1,03	(0,06-16,7)	0,982	0,226	1,15	(0,64-2,06)	0,634				

OR= Odds Ratio, IC 95% = Intervalo de confianza al 95%

**TABLA 12. Asociación entre los genotipos de ApoE y los diferentes tipos de Dislipidemias.**

	Hipercolesterolemia Aislada				Hipertrigliceridemia Aislada				Hiperlipidemia Combinada			
	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P
E2/E3 x E3/E3	0,697	2,22	(0,33-14,8)	0,404	7,900	0,04	(0,00-0,57)	0,05	0,040	1,28	(0,11-15,0)	0,841
E3/E4 x E2/E3	0,820	0,45	(0,07-2,62)	0,365	1,581	0,37	(0,07-1,81)	0,209	0,820	0,35	(0,34-3,68)	0,365
E2/E4 x E2/E3	1,397	0,55	(0,31-1,02)	0,237	0,052	0,75	(0,06-8,83)	0,819	0,629	0,60	(0,36-1,02)	0,428
E3/E4 x E3/E3	8,273	0,20	(0,06-0,64)	0,004	5,131	8,00	(1,01-63,0)	0,024	2,775	0,27	(0,05-1,36)	0,096
E2/E4 x E3/E3	3,041	0,69	(0,48-1,01)	0,081	5,147	16,0	(1,01-26,7)	0,023	0,824	0,77	(0,60-1,00)	0,364
E2/E4 x E3/E4	0,715	0,93	(0,88-1,01)	0,398	0,468	2,0	(0,26-15,0)	0,494	0,235	0,44	(0,89-1,01)	0,628

	cHDL Bajo Aislado				Hiperlipidemia con CHDL Bajo			
	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P	X <sup>2</sup>	OR	IC 95%	P
E2/E3 x E3/E3	-----	-----	-----	-----	2,601	0,63	(0,44-1,02)	0,107
E3/E4 x E2/E3	0,098	0,91	(0,84-1,02)	0,754	5,229	0,85	(0,75-0,95)	0,022
E2/E4 x E2/E3	-----	-----	-----	-----	4,278	0,22	(0,06-0,75)	0,039
E3/E4 x E3/E3	0,239	0,80	(0,72-1,01)	0,625	1,279	1,92	(0,61-6,01)	0,258
E2/E4 x E3/E3	-----	-----	-----	-----	0,618	2,40	(0,26-22,1)	0,432
E2/E4 x E3/E4	0,056	0,94	(0,89-1,01)	0,812	0,047	1,25	(0,16-9,37)	0,828

OR= Odds Ratio, IC 95% = Intervalo de confianza al 95%

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Frecuencia alélica y genotípica del gen ApoE en los pacientes estudiados

Los polimorfismos del gen ApoE han sido ampliamente estudiados principalmente en poblaciones europeas. Se ha observado que la frecuencia de los alelos del gen de ApoE se distribuye de manera desigual. Por ejemplo, la frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  disminuye claramente desde el norte hasta el sur del continente en oposición al alelo  $\epsilon 3$ . Es así como se ha observado que la prevalencia de  $\epsilon 4$  es mayor del 20% en Finlandia, Suecia y otros países del norte europeo y es aproximadamente del 5% en Cerdeña y la península Ibérica<sup>73-74</sup>. Por su parte en poblaciones americanas aparentemente sanas, se encontró que el alelo más frecuente es  $\epsilon 3$  con una distribución que varía desde el 83% hasta el 91,5%. Celaya, Rodríguez, Michelle y Arends, reportaron la frecuencia alélica del polimorfismo del gen ApoE en 215 individuos de una población de niños de ambos sexos. Los autores encontraron que la distribución general fue de 83% para el alelo  $\epsilon 3$ , 11% para  $\epsilon 4$  y 6% para  $\epsilon 2$ <sup>32</sup>. En Colombia, Torres y colaboradores describieron la siguiente frecuencia de los alelos polimórficos del gen ApoE en individuos sanos de Bogotá: 87%, 8% y 5% para  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$  y  $\epsilon 2$  respectivamente<sup>5</sup>. Por su parte, Landázuri y colaboradores, reportaron una frecuencia alélica del 91,6% para el alelo  $\epsilon 3$ , 5,3% para  $\epsilon 2$  y

3,1% para  $\epsilon 4$  en un grupo de escolares con edades entre los 8 y 18 años del departamento del Quindío<sup>23</sup>. Mientras que en población indígena de México el alelo  $\epsilon 3$  predominó en el 90% de los casos<sup>21</sup>.

En esta ocasión se han analizado los polimorfismos del gen apoE en 100 pacientes dislipidémicos de Valledupar-Colombia. En relación con las frecuencias, se pudo observar que en esta población no se encontró diferencia entre los valores observados de las frecuencias alélicas y genotípicas y los valores esperados, lo que permite afirmar que los individuos estudiados estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto sugiere que la población analizada no ha sido influenciada por migraciones o mezclas recientes.

Las frecuencias relativas de los alelos del gen ApoE en los individuos con dislipidemia de Valledupar, fueron:  $\epsilon 2$ : 0,055,  $\epsilon 3$ : 0,48 y  $\epsilon 4$ : 0,465. Se observa que la frecuencia de  $\epsilon 2$  fue similar a la descrita por otros investigadores en poblaciones Colombianas como Quindío y Bogotá mencionadas anteriormente, en donde se reportaron frecuencias relativas de 0,053 y 0,050 respectivamente<sup>5, 23</sup>. Por su parte la frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  en la muestra analizada difiere de la reportada en población adulta aparentemente sana<sup>5, 23, 56</sup>, respaldando lo documentado en muchos estudios que han establecido que la variación genética en los niveles de lípidos séricos se puede asociar con los genotipos de ApoE<sup>55, 75</sup>. Es así como en México<sup>21</sup>, Venezuela<sup>32</sup>, Colombia<sup>5, 23</sup> Brasil<sup>59</sup> y Omán<sup>6</sup>, investigadores pudieron establecer que el alelo  $\epsilon 4$  se relaciona con mayores niveles de colesterol total y bajas cifras de cHDL.

Por otro lado, el análisis de la distribución de los genotipos del gen ApoE en población aparentemente sana a nivel mundial, muestra que en general el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$  es el más frecuente, y los homocigotos de  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 4$  los menos reportados. En Europa países como Alemania<sup>25</sup>, Finlandia<sup>26</sup>, Francia<sup>27</sup> e Italia<sup>28</sup> reportan una frecuencia del genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$  que varía desde un 58,7% hasta un 68,4%. En estos países el homocigoto de  $\epsilon 2$  es el menos frecuente con una frecuencia de 0,9%, 0,3%, 0,8% y 0,4% respectivamente. El genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  fue encontrado con mayor frecuencia en Finlandia con un porcentaje del 30,6%; mientras que en Italia solo se observó con una frecuencia del 1,5%.

En China, Evans y colaboradores<sup>29</sup> reportaron una frecuencia genotípica de 70,9% para  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , 14,9% para  $\epsilon 4/\epsilon 3$  y 12,1% para  $\epsilon 3/\epsilon 2$ . Los genotipos menos frecuentes fueron  $\epsilon 2/\epsilon 2$  y  $\epsilon 4/\epsilon 4$  (1,7% y 0,7% respectivamente) y  $\epsilon 4/\epsilon 2$  no fue reportado.

Por su parte, Eto, Watanabe y Makino reportaron que en 576 individuos japoneses el 71,9% portaba el homocigoto de  $\epsilon 3$ , y el 19,3% el genotipo  $\epsilon 4/\epsilon 3$ . La frecuencia genotípica más baja fue para  $\epsilon 2/\epsilon 2$  (0,3%) y  $\epsilon 4/\epsilon 2$  (0,7%)<sup>30</sup>.

En este estudio, la frecuencia de los genotipos fueron  $\epsilon 3/\epsilon 4$  (72%),  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (17%),  $\epsilon 2/\epsilon 3$  (7%) y  $\epsilon 2/\epsilon 4$  (4%). Como se mencionó anteriormente no se encontraron los genotipos homocigotos para  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 4$  coincidiendo con lo reportado por Gamboa y colaboradores, quienes analizaron los polimorfismos del gen ApoE en 75 indígenas Mazatecas y 83 mestizos mexicanos. En ambas poblaciones se reporto ausencia de los genotipos  $\epsilon 2/\epsilon 2$  y  $\epsilon 4/\epsilon 4$ <sup>21</sup>. Esto también

coincide con los datos reportados en población de Quindío y sujetos sanos de Bogotá<sup>5, 23</sup>. En el departamento Colombiano del Quindío se observó una frecuencia del 90% para el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , 5,6% para  $\epsilon 2/\epsilon 3$  y 3,2% para  $\epsilon 3/\epsilon 4$ . En el estudio Bogotano el genotipo de mayor frecuencia fue igualmente  $\epsilon 3/\epsilon 3$  pero en este caso con un 77,1% de frecuencia. En Venezuela, este genotipo se observó en un 72,56% de los casos, seguido de  $\epsilon 3/\epsilon 4$  con un 16,28%. En esta última población si se reportaron los homocigotos para  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 4$ <sup>32</sup>.

A diferencia de lo descrito en las anteriores poblaciones, el genotipo que más predominó en los pacientes con dislipidemia de la ciudad de Valledupar estudiados en esta oportunidad, fue  $\epsilon 3/\epsilon 4$ . Esto puede sugerir que la sobre expresión del alelo  $\epsilon 4$  contribuye al desarrollo de dislipidemia dado que en las investigaciones mencionadas se estudiaron poblaciones aparentemente sanas. Los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado por Mcneely y colaboradores<sup>61</sup>, quienes con el fin de analizar las anomalías de las lipoproteínas en la Hipercolesterolemia Familiar Combinada (HLFC) y analizar factores asociados, realizaron un seguimiento durante 20 años a 287 individuos de 48 familias con esta enfermedad. Con respecto al polimorfismo del gen ApoE, los autores concluyeron que a los familiares que eran normolipémicos al inicio del estudio y que desarrollaron HLFC luego de los 20 años de seguimiento, se les asociaron las siguientes variables: incremento del índice de masa corporal durante el seguimiento, sexo masculino, y presencia del alelo Apo  $\epsilon 4$ ; confirmando que este alelo se relaciona con el desarrollo posterior de



HLFC. Así mismo, Houlston, Lewis y Humphnes también reportaron alta frecuencia relativa del alelo  $\epsilon 4$  al estudiar 59 pacientes con diagnóstico de Hiperlipidemia combinada, entre los que se encontraban 26 individuos con HLFC<sup>62</sup>. Los investigadores concluyeron que portar el alelo  $\epsilon 4$  puede contribuir al desarrollo del fenotipo de Hiperlipidemia combinada y HLFC.

Por su parte, Pei y colaboradores estudiaron a 43 familias con HLFC (n=449) y las compararon con 9 familias normolipémicas (n=73) para evaluar la influencia del polimorfismo del gen ApoE sobre los lípidos plasmáticos; y encontraron que la frecuencia relativa del alelo  $\epsilon 4$  en los individuos de las familias con HLFC afectados y no afectados, cónyuges y sujetos de familias normolipémicas fue de 13,8%, 5,3%, 9,1% y 6,8% respectivamente. En las familias con HLFC los genotipos con  $\epsilon 4$  ( $\epsilon 4/\epsilon 4$  y  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ) predominaron y se relacionaron con niveles significativamente más elevados de colesterol total y de cLDL cuando se comparaban con sujetos con  $\epsilon 3/\epsilon 3$ <sup>63</sup>.

## **7.2 Polimorfismos del gen ApoE y su impacto sobre los niveles de lípidos plasmáticos**

Numerosos estudios<sup>5, 6, 23, 32, 55-59</sup> concluyen que el alelo  $\epsilon 4$  puede influir en el incremento de los niveles de colesterol total, cLDL y bajos niveles de cHDL, siendo esto un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular; por ejemplo, Shin y colaboradores, determinaron el efecto de los polimorfismos del gen ApoE en los niveles de lípidos plasmáticos en adultos coreanos; y observaron que el

alelo  $\epsilon 4$  tuvo un efecto significativo sobre los niveles de colesterol total y cLDL presentando cifras más elevadas respecto a los individuos con alelo  $\epsilon 2$ <sup>56</sup>. Así mismo, Al-Yahyaee, Ganguly, Alkindi y Al-Bahrani<sup>6</sup> estudiaron la relación entre el polimorfismo del gen ApoE con los perfiles lipídicos y el riesgo de enfermedad coronaria en 244 pacientes con dislipidemia, de los cuales 67 tenían enfermedad arterial coronaria, y concluyeron que aquellos individuos con Apo  $\epsilon 4$  tenían niveles más altos de cLDL y una tendencia de mayor nivel promedio de colesterol total. En Colombia, Landázuri y colaboradores, establecieron que el genotipo de ApoE tuvo un efecto significativo sobre el colesterol total y el cLDL en los niños estudiados, reportando que el alelo  $\epsilon 4$  se asoció al aumento de estos lípidos. Los investigadores concluyeron también que en niños el alelo con efecto protector fue  $\epsilon 2$ , para todas las fracciones lipídicas; mientras que en niñas, este alelo fue protector solo para colesterol total y cLDL, puesto que en ellas el alelo  $\epsilon 2$  se asoció con aumento de triglicéridos y cVLDL<sup>23</sup>. En Bogotá al comparar las cifras de colesterol total entre los sujetos con los genotipos  $\epsilon 3/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$  y  $\epsilon 3/\epsilon 4$  se observaron niveles incrementados significativamente en el grupo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  comparados con los individuos con el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 2$ . Es así como los investigadores afirman que el polimorfismo del gen ApoE es un importante determinante genético de los niveles plasmáticos de lípidos y lipoproteínas, en especial porque el alelo  $\epsilon 4$  puede influir en el incremento de los niveles de colesterol total, cLDL y triglicéridos<sup>5</sup>. A esta misma conclusión llegaron Celaya y colaboradores. Según

los autores, las cifras de colesterol total y cLDL fueron más elevadas en los individuos con genotipos de  $\epsilon 4$ , presentaron cifras intermedias los portadores de genotipos con  $\epsilon 2$  y las cifras más bajas se asociaron a los genotipos con  $\epsilon 3$ . Al igual que el estudio de Bogotá, las cifras de triglicéridos fueron más bajas en sujetos con alelo  $\epsilon 2$  y las más altas en aquellos con alelo  $\epsilon 4$ . Por esto los investigadores reportan un efecto antiaterogénico relacionado con el alelo  $\epsilon 2$ <sup>32</sup>. Por otro lado, en un estudio realizado en 185 sujetos mestizos de Ouro-Petro Brasil; en el que se determinó el polimorfismo del gen ApoE en un grupo de dislipidémicos y un grupo control, se reportó que hubo diferencia significativa en los niveles de colesterol LDL de acuerdo con los alelos del gen ApoE, observándose los niveles más bajos en los portadores del alelo  $\epsilon 2$  en comparación con los individuos con los alelos  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ . El colesterol total, cHDL, triglicéridos, y la relación colesterol total/colesterol HDL no se vieron afectados por el polimorfismo de este gen<sup>59</sup>.

En este estudio se pudo establecer que las cifras de colesterol total y cLDL fueron más elevadas para individuos con alelo  $\epsilon 4$  y genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  ( $p > 0,05$ ) siendo la relación colesterol total/cHDL significativamente mayor para estos individuos (Tabla 10). Estos datos se justifican si se tiene en cuenta, que Las LDL son las lipoproteínas encargadas de entregar colesterol a las células periféricas gracias a un receptor específico de LDL presentes en la mayoría de las membranas celulares, el cual reconoce a la Apo B-100 y Apo E (Apo B/E) de esta lipoproteína. La unión de la LDL con el receptor ApoB/E permite que esta

entregue el colesterol a la vez que es depurada del plasma. El alelo polimórfico Apo  $\epsilon$ 4 tiene una menor afinidad que  $\epsilon$ 3 para los receptores de LDL (Apo B/E), por lo tanto este alelo se asocia con un aumento de colesterol total y cLDL. Del mismo modo, Apo  $\epsilon$ 4 presentó niveles más bajos de cHDL en esta población.

Por otra parte, se pudo observar un aumento en las cifras de triglicéridos en individuos con alelo  $\epsilon$ 2 (Tabla 10), presentando niveles mayores los pacientes con genotipo  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 4  $p > 0,05$ . Las lipoproteínas ricas en triglicéridos (QM y VLDL) interactúan con la LPL quien hidroliza sus triglicéridos convirtiéndose estas lipoproteínas en remanente de Quilomicrones y remanente de VLDL o IDL, las cuales son depuradas del plasma gracias a la unión de su Apo E con el receptor hepático LRP<sup>14, 51</sup>.  $\epsilon$ 2 presenta poca afinidad por este receptor, por lo cual ha sido asociado en numerosos estudios con Disbetalipoproteinemia o hiperlipoproteinemia tipo III<sup>64, 76</sup>. Esta enfermedad resulta de una acumulación de IDL y remanentes de QM producto del catabolismo defectuoso de estas partículas, dado que no pueden ser depuradas del plasma por poseer Apo E mutada ( $\epsilon$ 2). Los individuos con Hiperlipoproteinemia tipo III tendrán por lo general valores de triglicéridos de 300 a 600 mg/dL.

Sin embargo, se observó que en aquellos pacientes con alelo  $\epsilon$ 2 las cifras de colesterol total y cLDL fueron más bajas y las de cHDL más altas con respecto a los alelos  $\epsilon$ 3 y  $\epsilon$ 4, lo que sugiere un efecto protector antiaterogénico en los portadores del alelo  $\epsilon$ 2, contrario al efecto aterogénico en los individuos con alelo  $\epsilon$ 4, el cual está frecuentemente asociado a altos niveles de colesterol

total, cLDL y bajos niveles de cHDL. Sin embargo su efecto puede variar de acuerdo a factores como el sexo, estilo de vida, etnia y ambiente<sup>77, 78</sup>.

### **7.3 Asociación entre los alelos y genotipos del gen ApoE con los diferentes tipos de dislipidemias**

La dislipidemia más frecuente en los participantes de este estudio fue la "Hiperlipidemia (Hipercolesterolemia y/o Hipertrigliceridemia) más cHDL bajo". En este caso predominó la "Hipercolesterolemia más cHDL bajo" lo que se explica con la alta frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  en esta población. Este alelo, se relacionó con altos niveles de colesterol total, cLDL y bajos niveles de cHDL.

El alelo  $\epsilon 2$  se ha asociado con incremento de triglicéridos y muchos autores han establecido que aquellos individuos portadores del genotipo homocigoto de este alelo pueden llegar a desarrollar hiperlipoproteinemia tipo III o disbetalipoproteinemia, Morganroth, Levy y Fredrickson investigaron las características clínicas, bioquímicas y genéticas de esta enfermedad en 49 pacientes con edades entre 23 y 70 años, y entre otros hallazgos, reportaron alta frecuencia del alelo  $\epsilon 2$  y del genotipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$ <sup>76</sup>.

En esta oportunidad no se encontraron homocigotos para  $\epsilon 2$ , pero como lo muestra la Tabla 9, la Hipertrigliceridemia aislada fue significativamente más frecuente entre los individuos con el alelo  $\epsilon 2$  ( $p < 0,05$ ). Estos hallazgos respaldan el hecho de que pese a que  $\epsilon 2$  ejerce un efecto protector antiaterogénico, también se relaciona con aumento de triglicéridos.

Así mismo, en la Tabla 9 se puede observar que la Hipercolesterolemia aislada fue significativamente más frecuente en los individuos con el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$ , lo cual era de esperarse si se tiene en cuenta que  $\epsilon 4$  tienen menor afinidad por los receptores Apo B/E que participan en la depuración plasmática de cLDL. Estudios ya mencionados respaldan estos resultados. Landázuri y colaboradores en el departamento colombiano de Quindío y Celaya y colaboradores en Venezuela, coinciden en que el alelo  $\epsilon 4$  se asocia al incremento de colesterol total y cLDL en plasma. A esta misma conclusión llegaron Torres y colaboradores en Bogotá, quienes adicionalmente reportan que sujetos con el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 4$  presentan cifras significativamente más elevadas de colesterol total que otros genotipos<sup>5, 32</sup>.

Por otra parte, en la investigación de Ouro-Petro Brasil<sup>59</sup> se estudiaron 185 sujetos mestizos; a los que se les determinó el polimorfismo del gen ApoE. Para este estudio los sujetos se clasificaron en dos grupos, un grupo de dislipidémicos y un grupo control, se reportó que el alelo  $\epsilon 4$  fue el de mayor frecuencia en el primer grupo y  $\epsilon 2$  el menos frecuente. Así mismo los investigadores también demostraron que aquellos individuos con alelo  $\epsilon 3$  tenían 2 veces más riesgo de desarrollar dislipidemia con respecto a los portadores del alelo  $\epsilon 2$  (OR=2,31 p=0,025 IC95%=1,06-5,06); y los sujetos con genotipo del grupo  $\epsilon 4$  ( $\epsilon 3/\epsilon 4$  +  $\epsilon 4/\epsilon 3$ ) presentaban mayor riesgo de dislipidemia en comparación con aquellos que tenían genotipos del grupo  $\epsilon 2$  ( $\epsilon 2/\epsilon 2$  +  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ) (OR=3,69 IC95%=1,25-10,88).

En este estudio, se buscó correlacionar los alelos y genotipos del gen ApoE con el riesgo de padecer los diferentes tipos de dislipidemia. Se destaca que como era de esperar se observó que los genotipos con  $\epsilon 4$  presentaron significativamente mayor riesgo de desarrollar hipercolesterolemia aislada y hiperlipidemia (hipercolesterolemia en este caso) más cHDL bajo y que los genotipos con  $\epsilon 2$  presentan mayor riesgo para hipertrigliceridemia aislada al compararlos con  $\epsilon 3/\epsilon 3$  ( $p < 0,05$ ).

## 8. CONCLUSIONES

Las frecuencias relativas de los alelos del gen ApoE en pacientes dislipidémicos de Valledupar analizados en este estudio fueron de 0,05, 0,48, 0,465 para  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  respectivamente.

En esta población, es evidente la influencia del polimorfismo del gen ApoE sobre los niveles de Lípidos y lipoproteínas. Con los hallazgos obtenidos se confirma que aquellos individuos con el alelo  $\epsilon 4$  pueden desarrollar un efecto aterogénico por estar relacionado con cifras elevadas de colesterol total, cLDL y bajos niveles de cHDL.

Así mismo, aquellos individuos con alelo  $\epsilon 2$  podrían tener un efecto antiaterogénico por mostrar una tendencia opuesta, aunque se relacione en algunos casos con hipertrigliceridemia.

El análisis comparativo con otras poblaciones mostró similitud en la frecuencia relativa del alelo  $\epsilon 2$  y en la ausencia de los genotipos  $\epsilon 2/\epsilon 2$  y  $\epsilon 4/\epsilon 4$ . Sin embargo, en este estudio el genotipo más frecuente fue  $\epsilon 3/\epsilon 4$  y en las demás poblaciones fue  $\epsilon 3/\epsilon 3$ .



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvear C. Bioquímica Humana: De las bases a la clínica. Universidad de Cartagena 2007; 377-81
2. 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.
3. Organización Mundial de la Salud, Enfermedades Cardiovasculares. Nota informativa. OMS, septiembre de 2009.
4. Organización Panamericana de la Salud, Ministerio de la Protección Social República de Colombia. Situación de salud en Colombia. Indicadores Básicos 2008. Colombia. 2008.
5. Torres AL, Guerra-Muñoz M, Segre A, Wagner J, Alvarado M. Modulación de los niveles de lípidos y lipoproteínas por el polimorfismo de la apolipoproteína E en individuos sanos de Bogotá D.C. *NOVA*. 2005; 3:1-120.
6. Al-Yahyaee S, Ganguly S, Alkindi M, et al. Apolipoprotein E polymorphism in Omani Dyslipidemic patients with and without coronary artery disease. *Human Biol* 2007; 79: 93-102.
7. Anuurad E, Yamasaki M, Shachter N, et al. ApoE and ApoC-I polymorphisms: association of genotype with cardiovascular disease phenotype in African Americans. *J Lipid Res*. 2009; 50(7): 1472–78.

8. Li WH, Tanimura M, Luo CC, et al. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* 1998; 29: 245.
9. Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, et al. Structure and function of apolipoprotein A-I and high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 105
10. Burnett JR, Barret PH. Apolipoprotein B metabolism: tracer kinetics, models, and metabolic studies. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; 39: 89
11. Javitt NB. Cholesterol homeostasis: role of the LDL receptor. *FASEB J* 1995; 9: 1378.
12. Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997; 38: 2173
13. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240:622
14. Bishop M, Fody E, Schoeff L. Química Clínica Principios, Procedimientos y Correlaciones. Mc Graw Hills. 2006.
15. Scott J, Knott TJ, Shaw DJ, Brook JD. Localization of genes encoding apolipoproteins CI, CII, and E to the p13----cen region of human chromosome 19. *Hum Genet* 1985;71:144-6.
16. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982;257:4171-8.

17. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 1981;256:9077-83.
18. Berglund L. Apolipoproteína E: un candidato importante para la interacción entre genes y nutrientes?. Colección de trabajos distinguidos. Serie Factores de Riesgo. Sociedad Iberoamericana de información científica. 2005.
19. Howard BV, Gidding SS, Lui K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults: the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Am J Epidemiol* 1998;148: 859-62
20. Asakawa J, Takahashi N, Rosenblum BB, Neel JV. Twodimensional gel studies of genetic variation in the plasma proteins of Amerindians and Japanese. *Hum Genet* 1985; 70:222-230
21. Gamboa R, Hernández-Pacheco G, Hesiquio R, Zúniga J, Masso F, Montano LF, *et al.* Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico. *Hum Biol.* 2000;72:975-81
22. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S, *et al.* Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels: results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:1105–13.

23. Landázuri P, Loango N, Gallego ML, Restrepo B. Diferencias de sexo, edad y lípidos plasmáticos asociadas al polimorfismo de la apolipoproteína E en un grupo de escolares de Quindío, Colombia. *Biomédica* 2009; 29: 382-391.
24. Kamboh MI, Sepehrnia B, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins VI. Common polymorphism of apolipoprotein E in blacks. *Dis Markers* 1989;7:49–55.
25. Assman G, Schmitz G, Menzel HJ. Apolipoprotein E polymorphism and hyperlipidemia. *Clin Chem* 1984;30:641–3.
26. Lehtimäki T, Moilanen T, Viikari J, et al. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. *J Lipid Res* 1990;31:487–95.
27. Luc G, Bard JM, Arveiler D, et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction: the ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1412–19.
28. Cattin L, Fisicaro M, Tonizzo M, et al. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:91–4.
29. Evans AE, Zhang W, Moreel JFR, et al. Polymorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their relationship to plasma lipid variables in healthy Chinese men. *Hum Genet* 1993;92: 191–7.

30. Eto M, Watanabe K, Makino I. Increased frequencies of apolipoprotein E2 y E4 alleles in patients with ischemic heart disease. *Clin Genet* 1989; 36: 133-8
31. Lucotte G, Loirat F, Hazout S. Pattern of gradient of apolipoprotein E allele \*4 frequencies in western Europe. *Hum Biol* 1997; 69: 253-62.
32. Celaya J, Rodríguez A, Michelle P, Arends A. Estudios de polimorfismos del gen (APOE) de la apolipoproteína-E (Apo E) y su relación con niveles elevados de colesterol total, lipoproteínas y triglicéridos séricos en niños de edad escolar. *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Perez de León*. 2007;38(Suppl.1):19-26.
33. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Third Report of the NCEP. 2002; 106: 3143-50.
34. Mendivil C, Feliciano J, Sierra I. Guía de práctica clínica basada en la evidencia sobre el tamizaje, diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. División de lípidos y diabetes. Facultad de medicina Universidad Nacional de Colombia. 2007
35. Schaefer EJ, McNamara JR, Overview of the diagnosis and treatment of lipid disorders. In: Rifai N, Warnick GR. *Handbook of lipoprotein testing*. 1997: 25.
36. Mata P. Hiperlipidemias y riesgo cardiovascular. *Monocardio*. 2004: 4; 61.

37. Aguilar C, Gómez F, Lerman I et al. Diagnóstico y Tratamiento de las Dislipidemias. Rev de endocrinología y nutrición 2004; 12(1): 7-41.
38. Ros E, Laguna J. Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. Rev Esp Cardiol Supl. 2006;6:52-61.
39. Hopkins P, Heiss G, Ellison C, Province M, Pankow J, Eckfeldt J, Hunt S. Coronary artery disease in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia. Circulation 2003; 108: 519-523.
40. Wojciechowski AP, Farrall M, Cullen P, Wilson TM, Bayliss JD, Farren B, Griffin BA, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AI-CII-AIV gene cluster on chromosome 11q23- q24. Nature 1991; 349: 161-64.
41. Eichenbaum-Voline S, Olivier M, Jones EL, Naoumova RP, Jones B, Gau B, Patel HN, Seed M, Betteridge DJ, Galton DJ, Rubin EM, Scott J, Shoulders CC, Pennacchio LA. Linkage and association between distinct variants of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and familial combined hyperlipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 167-74.
42. Gagne E, Genest J Jr, Zhang H, Clarke LA, Hayden MR. Analysis of DNA changes in the LPL gene in patients with familial combined hyperlipidemia. Arterioscler Thromb 1994; 14: 1250-57.
43. Campagna AM, Baroni M, Maria A, Ricci G, Antonini R, Verna R, Arca M. Common variants in the lipoprotein lipase gene, but not those in the insulin receptor substrate [dash ]1, the [beta]-adrenergic receptor, and

the intestinal fatty acid binding protein-2 genes, influence the lipid phenotypic expression in familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* 2002; 51: 1298-1305.

44. Gehrisch S, Kostka H, Tiebel M, Patzak A, Paetzold A, Julius U, Schroeder HE, Hanefeld M, Jaross W. Mutations of the human hepatic lipase gene in patients with combined hypertriglyceridemia/hyperalphalipoproteinemia and in patients with familial combined hyperlipidemia. *J Mol Med* 1999; 77: 728-34.
45. Allayee H, Dominguez KM, Aouizerat BE, Krauss RM, Rotter JI, Lu J, Cantor RM, de Bruin TW, Lusic AJ. Contribution of the hepatic lipase gene to the atherogenic lipoprotein phenotype in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2000; 41: 245-52.
46. Allayee H, Aouizerat BE, Cantor RM, Dallinga-Thie GM, Krauss RM, Lanning CD, Rotter JI, Lusic AJ, de Bruin TW. Families with familial combined hyperlipidemia and families enriched for coronary artery disease share genetic determinants for the atherogenic lipoprotein phenotype. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 577-85.
47. Aouizerat BE, Allayee H, Bodnar J, Krass KL, Peltonen L, de Bruin TW, Rotter JI, Lusic AJ. Novel genes for familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 113-122.
48. Geurts JM, Janssen RG, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Cantor RM, Bu X, Aouizerat BE, Allayee H, Rotter JI, de Bruin TW.

Identification of TNFRSF1B as a novel modifier gene in familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2067-74.

49. Mahley RW, Huang Y, Rall S. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res* 1999; 40: 1933-1949.
50. Carro A, Martín M, Lozano I, Hevia S. cHDL bajo: más allá de la aterosclerosis. *Cardiocre* 2011; 46 (03): 39-41.
51. Pauciullo P. Lipoprotein transport and metabolism: a brief update. *Nutr metab cardiovasc dis* 2002; 12:90
52. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A, et al. The apolipoprotein E polymorphism: A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 338 – 49.
53. Smart M, Dedoussis G, Louizou E, Yannakoulia M, et al. APOE, CETP and LPL genes show strong association with lipid levels in Greek children. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases* 2010; 20 (1): 26-33.
54. Srinivasan SR, Ehnholm C, Wattigney W, et al. Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipoprotein concentrations in black versus white children: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 1993;42:381–6.



55. Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1250-5.
56. Shin MH, Kim HN, Cui LH, Kweon SS, Park KS, Heo H, *et al.* The effect of apolipoprotein E polymorphism on lipid levels in Korean adults. *J Korean Med Sci* 2005;20:361-6.
57. Medina-Urrutia AX, Cardoso-Saldana GC, Zamora- González J, Liria YK, Posadas-Romero C. Apolipoprotein E polymorphism is related to plasma lipids and apolipoprotein in Mexican adolescents. *Hum Biol* 2004;76:605-14.
58. Callas N, Poveda E, Baracaldo C, Hernández P, Castillo C, Guerra M. Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en un grupo de escolares del centrooriente colombiano: comparación con las concentraciones plasmáticas de lípidos y apolipoproteínas. *Biomédica*. 2007;27:526-36
59. Mendes-Lana A, Freitas G, Lima A, Nicolato R, Nascimento R, Coelho G, *et al.* Apolipoprotein E polymorphism in Brazilian dyslipidemic individuals: Ouro Petro Study. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 49-56.
60. Miltiadous G, Cariolou M, Elisaf M. HDL Cholesterol Levels in Patients with Molecularly Defined Familial Hypercholesterolemia. *Ann Clin Lab Sci* 2002; 32:50-54
61. McNeely MJ, Edwards KL, Marcovina SM, Brunzell JD, Motulsky AG, Austin MA. Lipoprotein and apolipoprotein abnormalities in familial

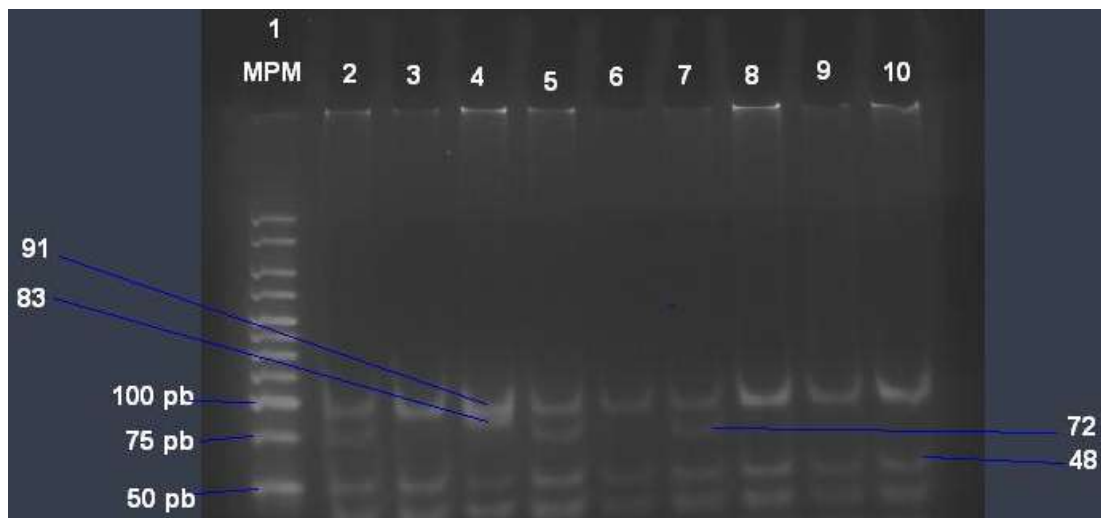
- combined hyperlipidemia: A 20-year prospective study. *Atherosclerosis* 2001; 159: 471– 81.
62. Houlston R, Lewis B, Humphries SE. Polymorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their possible roles in familial and nonfamilial combined hyperlipidemia. *Dis Markers* 1991; 9: 319 –25.
63. Pei W, Zhang Y, Sun Y, Gu Y, Wang Y, et al. Apolipoprotein E polymorphism influences lipid phenotypes in Chinese families with familial combined hyperlipidemia. *Circ J* 2006; 70: 1606–1610
64. Brewer HB, Zech LA, Gregg RE, Schwartz D, Schaefer EJ. Type III hyperlipoproteinemia: diagnosis, molecular defects, pathology, and treatment. *Ann Intern Med.* 1983;98:623–640.
65. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins: An integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 1997; 276: 34, 94, 148, 215, 273.
66. Hixson JE. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1237–44.
67. Ilveskoski E, Perola M, Lehtimäki T, et al. Age-dependent association of apolipoprotein E genotype with coronary and aortic atherosclerosis in middle-aged men: an autopsy study. *Circulation* 1999;100:608–13.

68. De Andrade M, Thandi I, Brown S, et al. Relationship of the apolipoprotein E polymorphism with carotid artery atherosclerosis. *Am J Hum Genet* 1995;56:1379–90.
69. Stengard JH, Weiss KM, Sing CF. An ecological study of association between coronary heart disease mortality rates in men and the relative frequencies of common allelic variations in the gene coding for apolipoprotein E. *Hum Genet* 1998;103:234–41.
70. Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, et al. The apolipoprotein  $\epsilon$  allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction. A substudy of the Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Circulation* 2000;101:1366–71.
71. Moreno A, Torres AL, Cartagena AE, Herrera MH. Determinación de la asociación del polimorfismo de la apolipoproteína E (Apo E) relacionada con la presencia de placa aterosclerótica coronaria. *NOVA*. 2006;4.1-116.
72. Hixson J, Vierner T. Restricción isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. 1990. *J Lip Res* 31: 545-8.
73. Valveny N, Esteban E, Kandil M, Moral P. APO E polymorphism in Spanish and Moroccan populations. *Clin Genet* 1997; 51: 354-6.
74. Gerdes LU, Gerdes C, Hansen PS, Klausen IC, Faergeman O, Dyerberg J. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Hum Genet* 1996; 98: 546-550.

75. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 487 – 95.
76. Morganroth J, Levy RI, Fredrickson DS. The biochemical, clinical, and genetic features of type III hyperlipoproteinemia. *Ann Intern Med.* 1975; 82:158–174.
77. Lucotte G, Loirat F, Hazout S. Pattern of gradient of apolipoprotein E allele \*4 frequencies in western Europe. *Hum Biol* 1997; 69: 253-62.
78. Corella D, Guillén M, Sáiz C, Portolés O, Sabater A, et al. Environmental Factors modulate the effect of the Apo E genetic polymorphism on plasma lipid concentrations: ecogenetic studies in a Mediterranean Spanish population. *Metabolism* 2001; 50: 936-44.

## ANEXO 1

### Lectura de bandas del gen ApoE luego de la digestión con la enzima de restricción HhaI en gel de poliacrilamida



En la posición 1 se observa el marcador de peso molecular (25 pb), En las posiciones 2-10 se observan muestras de algunos individuos participantes en este estudio, y se señalan las bandas 91 pb, 83 pb, 72 pb y 48 pb con las que se identifican los diferentes genotipos del gen Apo E.