

Modulación de los niveles de lípidos y lipoproteínas por el polimorfismo de la apolipoproteína E en individuos sanos de Bogotá D.C.

Ana Lucia Torres Ph.D.¹, Martha Guerra de Muñoz M.Sc.², Adriana Segrera¹, Jenny Wagner¹, Martha Alvarado M.Sc.³

¹Docente Investigadora, ²Directora de la Especialización en Bioquímica Clínica, Departamento de Nutrición y Bioquímica, Grupo de Investigación Clínico-Genético-Molecular en Dislipoproteínemias, ³Directora del Departamento de Matemáticas, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
Correspondencia: revistanova@unicolmayor.edu.co

Recibido: 02-05-2005 / Aceptado:09-06-2005

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del polimorfismo genético de la Apolipoproteína E (Apo E) sobre los niveles plasmáticos de lípidos y lipoproteínas en una cohorte de 200 individuos adultos sanos (20-65 años) residentes en Bogotá D.C. La frecuencia de los alelos de la Apo E fue 0.05 para el alelo e2; 0.87 para el e3 y 0.08 para el alelo e4. Los individuos se clasificaron de acuerdo al genotipo de la ApoE en: E3/2, E3/3, E4/3, E4/4 y E4/2, el genotipo de mayor frecuencia fue el E3/3 (77.1%). Al comparar la colesterolemia entre los sujetos E3/2, E3/3 y E4/3 se observaron niveles incrementados significativamente ($p < 0.05$) en el grupo E4/3 (172.1 ± 16.9) comparados con los del grupo E3/2 (148.7 ± 32.1). Los niveles de triglicéridos presentaron una tendencia hacia niveles más altos en los individuos con genotipo Apo E4/3 al compararlos con E3/3 y E3/2. En la población estudiada, el polimorfismo de la ApoE es un importante determinante genético de los niveles plasmáticos de lípidos y lipoproteínas, es así como la presencia del alelo e4 de la Apo E puede influir en el incremento de los niveles de colesterol total, colesterol-LDL y triglicéridos siendo un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Palabras Claves: Polimorfismo, lípidos, apolipoproteína E, enfermedad cardiovascular.

Abstract

The objective of the present work was to study the genetic polymorphism of apo E and his effect on plasma lipids and lipoproteins levels in one cohort of 200 healthy adult individuals (20-65 years) resident in Bogotá D.C. The frequency of apo E gene alleles was 0.05 for e2; 0.87 for e3 and 0.08 for e4. The individuals were classified according to the ApoE genotype in: e3/2, e3/3, e4/3, e4/4 and e4/2. The genotype of greater frequency (77.1%) was e3/3. When comparing the cholesterol levels between the subjects E3/2, E3/3 and E4/3, significantly ($p < 0.05$) increased levels were observed in the E4/3 group (172.1 ± 16.9) compared with the E3/2 (148.7 ± 32.1) group. The triglyceride levels showed a tendency towards higher levels in the group of individuals with apo E4/3 genotype compared to E3/3 and E3/2 groups. In these population studied, the ApoE polymorphism is an important genetic determinant of lipid and lipoprotein levels, the presence of e4 allele of ApoE gene determine increased levels of total cholesterol, cholesterol-LDL and triglycerides being these important risk factors for cardiovascular disease development.

Key words: Polymorphisms, lipids, apolipoprotein E, cardiovascular disease.

Introducción

En los últimos años pocas áreas de la medicina han recibido tanta atención en el campo experimental y en el clínico, como los problemas cardiovasculares debido a alteraciones en los lípidos particularmente el aumento en los niveles séricos de colesterol total, colesterol-LDL, triglicéridos y la disminución de los niveles séricos del colesterol-HDL, así como su relación con la aterosclerosis (1).

En salud pública este problema es de especial interés ya que afecta no solo a individuos después de la sexta década de vida, sino también a un porcentaje importante de sujetos desde la adolescencia hasta la adultez que están en plena producción intelectual y física, lo que ocasiona un problema en la sociedad a causa de la morbimortalidad. Según datos publicados por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística, en Colombia la enfermedad isquémica del corazón se encuentra como la segunda causa de mortalidad (tasa 52,1 por 100.000 habitantes) después de los homicidios (tasa 61,7 por 100.000 hab.) (2).

El nivel de colesterol plasmático y su variación interindividual está influenciado por varios factores genéticos. Los genes candidatos más importantes son aquellos que se encuentran codificando para alguno de los productos ya sea enzimas, receptores o apolipoproteínas involucrados en el metabolismo de las lipoproteínas. Dentro de estos genes se ha demostrado que cambios en el gen de la apo E ejercen un efecto importante en la variación normal de las concentraciones del colesterol total y el colesterol-LDL por lo que pueden ejercer un riesgo importante en el desarrollo de enfermedad coronaria (3).

La apolipoproteína E (apo E) es una proteína de 299 aminoácidos rica en arginina y con un peso molecular de 34 kDa. Esta proteína es un componente estructural de varias lipoproteínas, tales como los quilomicrones, los residuos de quilomicron, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y las de densidad intermediaria (IDL) y juega un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas ya que

media la unión de los residuos de quilomicron con el receptor hepático (LRP/a-2 macroglobulina) y de las IDL con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (receptor-LDL) (3). La Apo E es polimorfa, presenta 3 isoformas: apo E2, E3 y E4 que son el producto de 3 alelos diferentes e2, e3 y e4 de un sólo gen situado en el brazo largo del cromosoma 19 (4, 5). Los 3 alelos son resultado de sustituciones de nucleótidos en los codones 112 y 158 del exón 4 del gen (6, 7). El polimorfismo de la apo E ha sido ampliamente estudiado en diferentes poblaciones del mundo en las cuales se ha podido demostrar su influencia definitiva sobre los niveles de lípidos (8, 9, 10). Por lo tanto, es importante estudiar este factor cuyo impacto ha sido ampliamente demostrado en otras poblaciones y determinar si este componente genético tiene incidencia sobre los niveles de colesterol en nuestro medio.

Materiales y métodos

Sujetos

La muestra poblacional estuvo constituida por 200 individuos adultos sanos (20-70 años) de similares condiciones socioeconómicas. Mediante una encuesta se investigaron los antecedentes familiares y personales para incluir aquellos individuos que no exhibieran dislipidemias o tratamiento médico relacionado con el metabolismo lipídico. El estudio fue aprobado por los comités de ética de las instituciones ejecutoras del proyecto y siguiendo los lineamientos de la resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y en concordancia con la declaración de Helsinki.

Lípidos y lipoproteínas

La toma de la muestra se realizó mediante venopunción en dos tubos Vacutainer, uno con EDTA, para el aislamiento del DNA genómico a partir de los leucocitos y otro, sin anticoagulante para valorar el perfil lipídico, teniendo en cuenta los parámetros

TABLA 1. Efectos del genotipo de la apolipoproteína E sobre los niveles plasmáticos de lípidos y lipoproteínas.

	GENOTIPO DE LA APO E					*p
	3/2	3/3	4/3	4/4	4/2	
Número	10	94	15	2	1	
Colesterol total (mg/dL)	148.7±32.1	162.1±21.0	172.1±16.9	173.0±35.4	135.0	S
C-LDL (mg/dL)	88.1±21.7	102.3±21.0	108.0±15.9	120.5±21.9	78.0	NS
C-HDL (mg/dL)	45.0±7.6	42.2±10.6	40.9±6.8	36.0±14.1	37.0	NS
C-VLDL (mg/dL)	13.6±4.1	19.1±11.7	20.0±8.9	19.4±5.9	17.8	NS
Triglicéridos (mg/dL)	68.1±20.4	95.6±58.7	100.0±44.6	97.0±29.7	89.0	NS

ANOVA significativo $p < 0.05$; S= significativo, NS= no significativo. Colesterol total apo E4/3 vs E3/2 $p = 0.026$

preanalíticos recomendados universalmente. El colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL y los triglicéridos fueron determinados mediante métodos enzimáticos en un analizador RA-50 (Bayer S.A).

Análisis del ADN para el polimorfismo de la apo E

El ADN genómico se aisló de los leucocitos mediante el método de *Salting Out* (11). El genotipo de la apo E se determinó mediante amplificación por PCR de un fragmento de 244bp del exón 4 del gen de la apo E, se utilizaron dos oligonucleótidos con las siguientes secuencias: F6: 5' TAA-GCT-TGG-CAC-GGC-TGT-CCA-AGG-A 3' y F4 5' ACA-GAA-TTC-GCC-CCG-GCC-TGG-TAC-AC 3' descritos por Hixon y Vernier (12). Después de la amplificación, se digirieron los productos de PCR con 10 unidades de la enzima de restricción *HhaI* (12). Los fragmentos resultantes se separaron por tamaño en un gel de poliacrilamida al 10% no desnaturizante. El gel se coloreó con bromuro de etidio, y los fragmentos se visualizaron sobre una fuente de luz ultravioleta.

Análisis estadístico

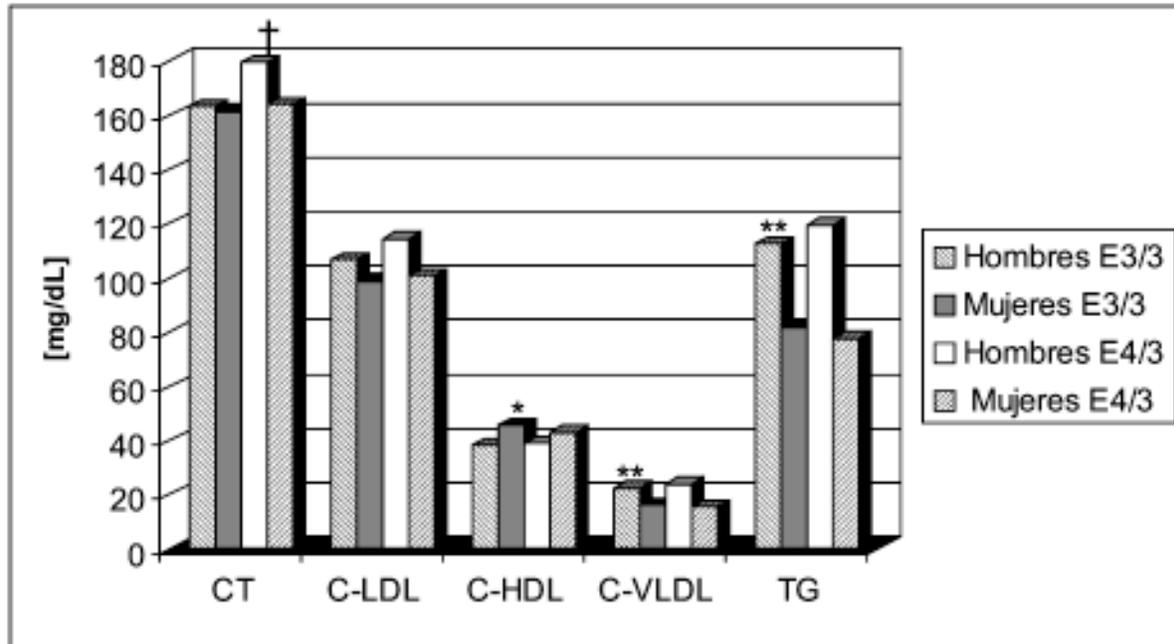
El método de *gen-counting* se utilizó para la determinación de las frecuencias alélicas del gen de

la apo E. Las comparaciones de los niveles de lípidos y lipoproteínas entre los genotipos de la apo E (e3/2, e3/3 y e4/3) fue realizado por análisis de varianza (ANOVA).

Resultados

Las frecuencias de los alelos de la apo E en los sujetos incluidos en el estudio fueron: 0.05 para el alelo $\epsilon 2$, 0.87, para el alelo $\epsilon 3$ y 0.08 para el alelo $\epsilon 4$. El genotipo de mayor frecuencia fue el E3/3 (77.1%), seguido del E4/3 (12.3%) y 8.2% para el E3/2; mientras que el E4/2 presentó la menor frecuencia (0.8%).

La tabla 1 muestra las características fenotípicas (colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL, colesterol-VLDL y triglicéridos) según el genotipo de la apo E (E3/2, E3/3, E4/3, E4/4 y 4/2). Los niveles de colesterol total y colesterol-LDL fueron más bajos en aquellos individuos con el genotipo E3/2 al compararlos con los niveles de los grupos E3/3, E4/3 y E4/4. Los niveles de colesterol total fueron estadísticamente significativos ($p = 0.026$) entre los grupos apo E3/2 y E4/3, exhibiendo los individuos E4/3 niveles más altos. La HDL mostró tendencia a disminuir sus niveles en el siguiente orden: E4/4 < E4/3 < E3/3 < E3/2. Los individuos con el genotipo E4/4



Prueba t: significativo $p < 0.05$. * Hombres vs Mujeres C-HDL=0.0005; **C-VLDL y Triglicéridos =0.02.
 † $p=0.007$, cuando se comparan los valores de colesterol total entre hombres apo E3/3 vs E4/3.

Figura 1. Efectos del genotipo de la apolipoproteína E y del sexo sobre los niveles plasmáticos de lípidos y lipoproteínas.

presentaron los niveles más altos de colesterol-LDL y los más bajos de colesterol-HDL (figuras 2 y 3). En cuanto a los niveles de triglicéridos hubo una tendencia hacia niveles más altos en los individuos con el genotipo apo E4/3 al confrontarlos con los genotipos apo E3/3 y 3/2, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (tabla 1).

El análisis de la influencia del genotipo de la apo E y del género sobre los niveles de lípidos y lipoproteínas se hizo sólo con los grupos apo E3/3 y E4/3 (figura 1) ya que el grupo E3/2 no tenía un número suficiente para efectuar el análisis estadístico comparativo (9 mujeres y 1 hombre). Se comprobó que no había diferencia de edad entre los dos géneros para poder realizar la comparación de los niveles de lípidos y lipoproteínas. Los integrantes del grupo apo E3/3 presentaron diferencias significativas en los niveles de colesterol-HDL, las mujeres mostraron los niveles más altos. El colesterol-VLDL y triglicéridos fueron significativamente más bajos ($p=0.02$) en las mujeres. El colesterol-LDL no presentó diferencias entre los géneros teniendo en cuenta el valor P ($T \leq t$) de

dos colas (0.08), pero el valor 1.77 del estadístico t, cercano al valor crítico (1.99) indica tendencia hacia valores diferentes.

La figura 1 muestra la comparación de los niveles de lípidos y lipoproteínas entre géneros de los integrantes del grupo con genotipo Apo E3/3 y Apo E4/3. La comparación de los niveles de lípidos y lipoproteínas entre géneros al interior de este grupo mostró una tendencia hacia niveles más altos de colesterol total en los hombres ($P \leq t$) dos colas= 0.09, valor del estadístico $t = 1.90$, valor crítico de $t = 2.23$). Los niveles de colesterol-VLDL y triglicéridos también muestran tendencia hacia valores más altos en los hombres, considerando que el valor del estadístico t está muy cercano al valor crítico de t (C-VLDL: valor del estadístico $t = 2.06$, valor crítico de $t = 2.18$; triglicéridos: valor del estadístico $t = 2.07$, valor crítico de $t = 2.18$).

Discusión

Las frecuencias de los alelos de la Apo E en la población bogotana estudiada fueron: alelo e2, 0.05;

e3, 0.87; e4, 0.08, similares a las observadas por otros investigadores en poblaciones caucásicas (13). La frecuencia del alelo e2 de la población estudiada se asemeja a la encontrada en europeos (Alemania, 0.07; Finlandia, 0.06), japoneses y turcos (.08; 0.06). Para el alelo e3, la frecuencia es comparable con la de Japón y Turquía (0.84; 0.88) y es ligeramente aumentada al compararla con alemanes (0.77), estadounidenses (0.76), finlandeses (0.69) y sudaneses (0.61). La frecuencia del alelo e4 en la población bogotana se puede comparar con las frecuencias halladas en las poblaciones asiáticas (chinos y japoneses) así como, en los hispanos residentes en Estados Unidos, donde se encontró una frecuencia menor del alelo e4 (8, 14).

En la muestra poblacional estudiada se observó que los individuos que presentaban el genotipo E3/2 exhibieron niveles significativamente más bajos de colesterol total si se comparan con los E4/3. Los niveles de colesterol-LDL del genotipo E3/2 mostraron una tendencia a valores más bajos al confrontarlos con los E3/3 y E4/3. Los individuos con el genotipo Apo E4/4 mostraron los niveles más altos de colesterol total y colesterol-LDL, lo cual podría indicar como la presencia del alelo e2 puede influenciar en la concentración de éstos lípidos y lipoproteínas en nuestra población, corroborando los numerosos estudios efectuados en poblaciones normolipidémicas donde se ha observado la asociación del alelo e2 con niveles más bajos de CT y C-LDL, mientras que el alelo e4 lo está con cifras más altas de estos dos parámetros (6, 14-17).

El impacto del polimorfismo de la Apo E sobre los niveles de colesterol-HDL, no fue significativo entre los diferentes genotipos en la población estudiada, pero se observó una tendencia hacia niveles de colesterol-HDL más bajos en el grupo con el genotipo Apo E4/3 comparado con los niveles del grupo E3/2. Estas observaciones son similares a las obtenidas en otros estudios, donde se ha

encontrado que el polimorfismo de la Apo E está asociado con los niveles de colesterol-HDL.

La presencia del alelo e4 se correlaciona con niveles más bajos de colesterol-HDL (8, 18). El polimorfismo de la Apo E ha sido también asociado con los niveles de triglicéridos. Basados en los resultados de un meta-análisis, Dallongeville y col. (18) mostraron que los niveles de triglicéridos fueron más altos en sujetos con el alelo e2 y en sujetos con el fenotipo E4/3. Nuestros resultados muestran esta misma tendencia, los sujetos con el genotipo Apo E4/3 poseen los niveles más altos de triglicéridos.

En la población estudiada de Bogotá es claro el impacto del polimorfismo de la Apo E sobre los niveles de lípidos y lipoproteínas. Los sujetos con el genotipo Apo E4/3 y E4/4 presentaron los niveles más altos de colesterol total, colesterol-LDL, triglicéridos y los más bajos de colesterol-HDL. Los sujetos con el genotipo Apo E3/2 mostraron la tendencia opuesta a los de los genotipos E4/3 y E4/4, ya que sus niveles de colesterol total, colesterol-LDL y triglicéridos fueron los más bajos, mientras que el colesterol-HDL fue más alto. Así, la presencia del alelo e4 de la Apo E puede tener una influencia en la presencia de trastornos cardiovasculares en nuestra población, al incrementar los niveles de colesterol total y colesterol-LDL, y el alelo e2 un rol protector ya que su presencia está correlacionada con niveles más bajos de colesterol total, y más incrementados de colesterol-HDL, como se ha observado en estudios en otras poblaciones (8-10, 17, 19).

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por subvención de la Fundación Banco de la República. Agradecemos al personal que hace parte del grupo de investigación Clínico-Genético-Molecular en Dislipoproteínemias por su colaboración en el trabajo de laboratorio y en la revisión del manuscrito.

Referencias

1. Assman G. Lipid metabolism and coronary heart disease. Primary prevention, diagnosis and therapy guidelines for general practice. Munich: MMV Medizin Verlag, 1993.
2. Ministerio de Salud, Dirección General de Salud Pública, Grupo de Vigilancia en Salud Pública. Mortalidad por grupo etario según causas, Colombia 1999. Fuente: DANE, archivo de defunciones; 2001.
3. Mahley Robert W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240:622-630.
4. Lin-Lee YC, Kao FT, Cheung P, Chan L. Apolipoprotein E gene mapping and expression: Localization of the structural gene to human chromosome 19 and expression of apo E mRNA in lipoprotein- and non-lipoprotein-producing tissues. *Biochemistry*. 1985;24:3751-3756.
5. Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J. Biol. Chem*. 1985;260:6240-6247.
6. Utermann G, Pruin N, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clin. Genet*. 1979;15:63-72.
7. Zannis VI, Breslow JL, Utermann G, Mahley RW, Weisgraber KH, Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS, Schonfeld G, Hazzard WR, Blum C. Proposed nomenclature of apoE isoforms, apoE genotypes, and phenotypes. *J. Lipid Res*. 1982;23:911-914.
8. Kamboh MI, Aston CE, Ferrell RE, Hamman RF. Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanics and non-Hispanic whites. *Atherosclerosis*. 1993;98:201-211.
9. Boerwinkle E, Utermann G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. *Am. J. Hum. Genet*. 1988;42:104-112.
10. Utermann G. Genetic polymorphism of apolipoprotein E. Impact on plasma lipoprotein metabolism. In: Crepaldi G, Tiengo A, Baggio G, (eds). *Diabetes, obesity and hyperlipidemias-III*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp. 1-28, 1985.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16: 1215.
12. Hixson JM, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J. Lipid Res*. 1990;31:545-548.
13. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988;8:1-21.
14. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Császár A, Utermann G. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am. J. Hum. Genet*. 1991;49: 338-349.
15. Ehnholm C, Lukka M, Kuusi T, Nikkilä E, Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J. Lipid Res*. 1986;27: 227-235.
16. Sepehrnia B, Kamboh MI, Adams-Campbell LL, Bunker CH, Nwankwo M, Majumder PP, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. X. The effect of the apolipoprotein E polymorphism on quantitative levels of lipoproteins in Nigerian blacks. *Am. J. Hum. Genet*. 1989;45: 586-591.
17. Wardell MR, Suckling PA, Janus ED. Genetic variation in human apolipoprotein E. *J. Lipid Res*. 1982;23:1174-1182.
18. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apo E phenotype: A meta-analysis. *J. Lipid Res*. 1992;33:447-454.
19. Boerwinkle E, Vivvikis S, Welsh D, Steinmetz J, Hanash SM, Sing CF. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. II. The role of the apolipoprotein E polymorphism in determining levels, variability, and covariability of cholesterol, betalipoprotein, and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am. J. Med. Genet*. 1987;27:567-582.