

30  
2el.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

" DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DEL GEN  
DE LA APOLIPOPROTEINA E EN UNA MUESTRA  
DE LA POBLACION MEXICANA NORMAL "

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
JORGE LUIS GUERRERO CAMACHO

ASESORES:  
M. EN C. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO  
Q.F.B. PETRA YESCAS GOMEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
 DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
 P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS "Determinación de la frecuencia del gen de la apolipoproteína E en una muestra de la población mexicana normal".

que presenta al pasante Jorge Luis Guerrero Canacho  
 con número de cuenta: 0702311-8 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
 "POR MI PAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 25 de Febrero de 1997.

PRESDENTE Dra. Gloriflores Rosales  
 VOCAL J. F. Ma. Esther Revuelta Miranda  
 SECRETARIO J. e. J. Genara Díaz Barriga Arceo  
 PRIMER SUPLENTE Q. Arcadia Hernández Beltrán  
 SEGUNDO SUPLENTE Q. C. B. Norma L. Delgado Buenrostro

**AGRADECIMIENTOS**

***Dra. María Elisa Alonso Vilatela:***

***Por permitirme la realización de este trabajo  
y por la ayuda que desde un principio  
he recibido de su parte.***

***Q.F.B. Petra Yescas Gómez:***

***Por entrenarme en el campo de la Biología Molecular  
y dirigir con tanto empeño esta tesis  
que significa mucho para mí.***

***Q.F.B. Aurelio Jara Prado:***

***Por enseñarme lo que no hubiera aprendido  
sin su valiosa intervención,  
por sacarme de apuros en momentos críticos  
y por todos sus consejos.***

**Sr. José Luis Guerrero Sánchez y  
Sra. Esperanza Camacho Ramírez:**

***Porque en todo momento me impulsaron,  
con su amor y dedicación,  
a seguir en la lucha y mirar siempre adelante.***

**Q.F.B. Fanny Robledo San Juan:**

***Porque gracias a su gran amor  
recuperé la fe y la confianza,  
y en los momentos más difíciles  
me dió apoyo y ánimos  
para seguir adelante.***

***Familiares y amigos:***

***Porque de una u otra forma  
siempre me apoyaron.***

***A todos ustedes: Gracias.***

*DEDICATORIAS*

## *A mis padres*

*Los siempre participaron  
en mi formación académica  
y cuyo anhelo de verme concluir  
mi carrera, fuera convertido  
en la más viva ilusión  
que abrigaran nuestros corazones.*

*Los con devoción y sacrificios  
motivaron el empeño en mi alma,  
forjando así el espíritu de lucha  
y la firme convicción  
de alcanzar lo que uno quiere  
por más lejos que parezca estar.*

*Podrían razonar para lograr  
la coronación de nuestro esfuerzo,  
en premio al dolor y la amargura  
que juntos llevamos a cuerdas  
aportando los embates del destino.*

*A ti, padre venerado,  
y a ti, madre iluminada,  
debo mis trabajos como fruto  
de vuestro amor y sacrificio.*

*De no haber sido por ustedes,  
nada de lo que soy  
y nada de lo que hoy digo  
hubiera podido ser.*



*A mis hermanos*

*Al quince largo colocado  
en un lugar especial de mi concepción.*

*Luzmila, Abel y Felipe,  
aquí que se abra cuando  
lo que esto significa  
pues no es sólo un pequeño libro  
con unas letras para ustedes.*

*Aquí hay mucho más  
de lo que puedan imaginar  
y es dedicado a ustedes,  
quién algún día recorden  
esta hoja de papel  
en cuyo cuerpo algún escrito  
que los guíe y formen  
parte de mi existir.*

*A mi novia*

*Sean amiga, sin dudar alguna,  
es mi confidente y consiguera,  
mi compañera en la ventura  
y en los infortunios;  
mejor maravillosa que con los amores  
realizar las cosas más grandes  
y nunca imaginadas  
de quien es por tí  
el hombre más feliz sobre la Tierra.*

*Al tí, Jerry,  
dávate de mis días felices  
y mis momentos insubstanciales;  
fue compañera de mi alma  
que me das el amor a cambio de nada,  
a tí dedico este trabajo  
para servir con brío a una  
la historia estudiantil de aquellos asociados,  
compañeros de carrera,  
en quienes nacieron los sentimientos  
invaluables que habrán de servirlos  
para toda la vida.*

*Con todo mi amor  
para mi Momento todo.*

***Al Departamento de Genética:***

***Para todos y cada uno de sus integrantes***

***(Elisa, Aurelio, Petra, Lety, Chayo, Conchita, Gabino,  
[el adoptado: Enrique], Roberto, Nacho y Adriano)***

***va dedicada esta tesis  
agradeciendo el afecto y la ayuda que  
de cada uno de ellos he recibido.***

***A mis tíos:***

***Daniel, Malú, Toño, Lupita, Tere,  
Chino, Mario, Delia, Rosa, Chava,  
Francisco y Andrés.***

***Les dedico mi tesis profesional  
por el afecto y apoyo que en su momento  
me demostraron.***

*Este trabajo fué realizado  
en el Laboratorio de  
Genética y Biología Molecular del  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
"Manuel Velasco Suárez"*

## INDICE DE CONTENIDO

Tema	Página
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<i>i</i>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<i>ii</i>
<b>GLOSARIO</b>	<i>iii</i>
<b>ABREVIATURAS</b>	<i>vii</i>
<b>RESUMEN</b>	<i>ix</i>
<b>I. INTRODUCCION</b>	
<b>I.1. Antecedentes</b>	<b>1</b>
<b>I.2. Digestión, movilización, y transporte de ácidos grasos</b>	<b>3</b>
<b>I.3. Lipoproteínas</b>	<b>4</b>
<b>I.3.1. Composición y aspectos estructurales</b>	<b>4</b>
<b>I.3.2. Clasificación de las lipoproteínas</b>	<b>5</b>
<b>I.3.3. Genética de las apolipoproteínas</b>	<b>7</b>
<b>I.3.4. Características de las apolipoproteínas y su relación con las lipoproteínas</b>	<b>8</b>
<b>I.3.5. Principales enzimas que participan en el transporte de los lípidos por las lipoproteínas</b>	<b>9</b>
<b>I.3.6. Receptores de lipoproteínas</b>	<b>10</b>
<b>I.3.7. Metabolismo de las lipoproteínas</b>	<b>11</b>
<b>I.3.7.1. Biosíntesis y catabolismo de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B</b>	<b>12</b>
<b>I.3.7.2. Formación de HDL y transporte de colesterol en plasma</b>	<b>14</b>
<b>I.4. Apolipoproteína E</b>	<b>16</b>
<b>I.4.1. Papel de la apo E en Hiperlipoproteinemia tipo III</b>	<b>16</b>
<b>I.4.2. Caracterización bioquímica de la Apolipoproteína E</b>	<b>19</b>
<b>I.4.2.1. Estructura del gen Apo E</b>	<b>19</b>
<b>I.4.2.2. Estructura y función de la apo E</b>	<b>20</b>
<b>I.4.2.3. Sitios de síntesis de la apo E</b>	<b>22</b>
<b>I.4.3. Bases moleculares del polimorfismo de la Apolipoproteína E</b>	<b>24</b>

I.4.4.	Impacto del locus de apo E en las lipoproteínas y lípidos del plasma	25
I.4.5.	Papel de la apo E en el metabolismo normal de remanentes	27
I.4.6.	Depósitos de $\beta$ -VLDL en macrófagos	30
I.4.7.	Apolipoproteína E y Sistema Nervioso Central	31
I.4.8.	Enfermedad de Alzheimer, proteína $\beta$ -amiloides y apolipoproteína E	32
I.4.8.1.	<i>Asociación patogénica</i>	34
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
II.1.	<i>Objetivo General</i>	37
II.2.	<i>Objetivos Particulares</i>	37
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y METODOS</b>	
III.1.	<i>Material</i>	39
III.1.1.	Químico	39
III.1.2.	Biológico	39
III.1.3.	Equipo	39
III.2.	<i>Métodos</i>	41
III.2.1.	Obtención de la muestra	41
III.2.2.	Extracción de DNA	41
III.2.3.	Cuantificación de DNA	41
III.2.4.	Amplificación de DNA	42
III.2.5.	Digestión de DNA	43
III.2.6.	Electroforesis	43
III.2.7.	Análisis de genotipos	44
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
IV.1.	<i>Obtención de la muestra</i>	47
IV.2.	<i>Extracción de DNA</i>	47
IV.3.	<i>Cuantificación de DNA</i>	47
IV.3.1.	Espectrofotometría	47
IV.3.2.	En gel de agarosa	47

<b>IV.4.</b>	<i>Amplificación de DNA</i>	48
<b>IV.5.</b>	<i>Electroforesis en gel de acrilamida</i>	48
<b>IV.6.</b>	<i>Análisis de genotipos</i>	50
<b>V.</b>	<b>DISCUSION</b>	
<b>V.1.</b>	<i>Comparación con otros estudios</i>	54
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	59
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	61

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Digestión, movilización y transporte de ácidos grasos.	4
2. Estructura molecular de una lipoproteína.	5
3. Vías endógena y exógena del metabolismo de las lipoproteínas.	11
4. Metabolismo de los quilomicrones.	13
5. Metabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).	14
6. Transporte de colesterol inverso.	16
7. Diferenciación de lipoproteínas por ultracentrifugación y electroforésis en papel.	17
8. Isoelectroenfoco de apo-VLDL que muestra los tres fonotipos homocigotos de apo E.	18
9. Localización del gen APO E en el cromosoma 19.	21
10. Estructura secundaria de Apo E.	21
11. Secuencia de aminoácidos de Apo E en una región crítica para la unión al receptor.	23
12. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las tres isoformas de apo E.	26
13. Efectos de los alelos de apo E en varios parámetros lipoprotéicos.	26
14. Pasos involucrados en la captación de remanentes del plasma.	28
15. Los heparán sulfato proteoglicanos son los responsables de la unión inicial de los remanentes ricos en apo E.	29
16. Proteína Precursora del Amiloide (PPA).	33
17. Unión isoformo-específica de apo E con la proteína tau.	35
18. Diagrama de flujo que representa a grandes rasgos la metodología realizada.	40
19. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	43
20. Haplotipos de apo E.	44
21. Gel de poliacrilamida con los genotipos de apoE característicos de la población mexicana.	49



## **INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Propiedades físicas de las lipoproteínas del plasma humano.	6
2. Composición química de las lipoproteínas plasmáticas normales en humano.	7
3. Características de las apolipoproteínas plasmáticas en humanos normales.	8
4. Enzimas clave del transporte de lípidos en plasma.	9
5. Frecuencias genotípicas del gen APO E en población mexicana.	50
6. Frecuencias alélicas del gen APO E en población mexicana.	51
7. Análisis estadístico de las diferencias genotípicas y alélicas más representativas entre hombres y mujeres de la población mexicana.	52
8. Frecuencias genotípicas y alélicas en diferentes poblaciones y su comparación con las frecuencias determinadas en nuestra población.	55

## GLOSARIO

**Alelos.** Genes que ocupan el mismo lugar (*locus*) en los cromosomas homólogos.

**$\beta$ -Amiloide.** Proteína que se acumula en las células y constituye las marañas neurofibrilares y las placas neuríticas, encontradas en cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer.

**Amplificación de DNA.** Término que se aplica a la síntesis o polimerización de una región determinada de DNA. Procedimiento de laboratorio que consiste en llevar a cabo una Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR.

**Anfipático.** Nomenclatura que reciben las moléculas que son parte hidrófobas, o insolubles en agua y parte hidrófilas o solubles en agua.

**Apolipoproteínas.** Proteínas unidas a lípidos, responsables del transporte de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol entre los órganos. Se designan "apo" cuando están en su forma libre de lípidos. Se combinan con varias clases de lípidos para formar varias clases de lipoproteínas.

**Apoproteínas.** Una o más proteínas o polipéptidos que, por su presencia, caracterizan a las lipoproteínas. También son llamadas apolipoproteínas.

**Clona.** Número grande de células o moléculas que son idénticas y provienen de una sola célula o molécula precursora.

**Clonar.** Producir clonas.

**Codificar.** Transformar, mediante un código contenido en el DNA, la formulación de un mensaje o mRNA.

**Codón.** Conjunto de tres nucleótidos encontrados en el DNA, organizados en palabras clave.

**Cromosoma.** Cuerpo discreto de origen nuclear formado por la compactación y superenrollamiento de la cromatina. En humanos existen 23 pares de cromosomas. Cada cromosoma consiste de dos cromátidas unidas por una pequeña estructura, llamada centrómero.

**Digestión de DNA.** Procedimiento a través del cual se obtienen fragmentos de DNA amplificado por acción de una enzima de restricción.

**DNA blanco.** Región de DNA genómico que se pretende amplificar mediante PCR.

**DNA genómico.** Es el DNA total de origen nuclear.

**cdNA.** Molécula de DNA de origen sintético que es complementaria de una molécula de mRNA y es sintetizada por la acción de la transcriptasa inversa.

**Endocitosis.** Función celular en que la célula introduce partículas o moléculas a su interior, envueltas en una vesícula formada con su propia membrana celular llamada endosoma.

**Endonucleasa de restricción.** Enzima que rompe enlaces internos en el DNA o el RNA cortando las dos tiras de la molécula en sitios altamente específicos dictados por la secuencia de bases.

**Endosoma.** Vesícula formada por membrana plasmática que contiene la partícula o molécula endocitada por la célula.

**Escisión.** Proceso por el cual los intrones son removidos del RNA precursor y por el que los exones son enlazados juntos.

**Estructura al azar.** Denominada también como enrollamiento al azar. Las regiones proteicas que no se identifican por organizaciones como hélices u hojas plegadas, se dice que existen en esta conformación.

**Estructura primaria.** Es el orden de los aminoácidos en la cadena o cadenas polipeptídicas y la ubicación de los enlaces disulfuro, si están presentes.

**Exocitosis.** Función celular en que se efectúa el contacto de dos membranas internas para liberar extracitoplasmicamente el contenido de la vesícula.

**Exón.** Secuencia de un gen que es expresada como mRNA.

**Fenotipo.** Caracteres físicos de un individuo que son el resultado de las características estructurales y metabólicas expresadas por los genes.

**Gen.** Porción de una molécula de DNA codificada para la síntesis de una determinada cadena polipeptídica. Unidad fundamental de la herencia.

**Genotipo.** Conjunto de los genes de un sujeto.

**Haplotipo.** Término usado para indicar la composición genética haploide de un locus complejo.

**$\alpha$ -Hélice.** Conformación altamente ordenada, mantenida por puentes de hidrógeno formados entre residuos peptídicos.

**Heterocigoto.** Individuo que tiene dos alelos diferentes en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

**Hidrofóbico.** Que no tiene afinidad por el agua, como las moléculas no polares o las regiones no polares de las moléculas grandes.

**Hipercolesterolemia.** Aumento de colesterol plasmático total.

**Hiperlipidemia.** Aumento de lípidos totales en plasma.

**Hiperlipoproteinemia.** Aumento de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad en plasma.

**Hipertrigliceridemia.** Aumento de triglicéridos de VLDL totales en plasma.

**Hipocampo.** Región cerebral involucrada en el sistema límbico. Se ubica en la parte central inferior de la masa cerebral.

**Hipocolesterolemia.** Disminución de colesterol total en plasma.

**Homocigoto.** Individuo que posee un par de alelos idénticos en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

**Índice de flotación.** La velocidad a la cual cada lipoproteína flota en una solución de NaCl (peso específico 1.063) puede expresarse en unidades Svedberg (S) de flotación. Una unidad  $S_r$  es igual a  $10^{13}$  cm/seg/dina/g a 26 °C.

**Intrón.** Porción del DNA que se transcribe a RNA pero que es eliminada enzimáticamente de ésta molécula antes de que el mRNA pase al citoplasma y se traduzca.

**Isoforma.** Término empleado para indicar que una proteína es semejante a otra y sólo difiere en algún residuo aminoácido (apo E 2, 3, 4).

**Ligando.** Proteína o porción de proteína que se une específicamente a su receptor.

**Lipofilicidad.** Afinidad por los lípidos.

**Lipoproteínas.** Conjunto de lípidos y proteínas que son constituyentes celulares importantes que se encuentran en la membrana celular y en las mitocondrias y sirven también como medios para transportar lípidos en la sangre.

**Lisoxoma.** Organelo celular membranoso en el cual se encuentran enzimas hidrolíticas.

**Marañas neurofibrilares.** Depósitos proteináceos anormales formados básicamente por la proteína  $\beta$ -amiloido.

**Mutante.** Gen alterado o modificado. Individuo portador de éste gen.

**Normalipidemia.** Concentración plasmática normal de quilomicrones y VLDL.

**Oligonucleótidos.** Secuencias cortas de DNA con tamaños de aproximadamente 20 pb, que sirven como iniciadores en el PCR. Estos DNAs, conocidos también como "primers", flanquean la región de interés que se desea amplificar.

**Oligos.** Ver oligonucleótidos.

**Placas neuríticas.** Masas amorfas formadas por aglomeración de terminaciones nerviosas y proteína  $\beta$ -amiloido.

**Hoja plegada  $\beta$ .** La cadena polipeptídica está casi completamente extendida.

**Polimorfismo.** Es la existencia de dos o más genotipos alternativos en una población, determinados por factores genéticos y que presentan frecuencias demasiado elevadas para que puedan ser mantenidas sólo por la mutación.

**Proteoglicanos.** Proteoglicanos. Compuestos formados por glucosaminoglucanos (mucopolisacáridos) constituidos, a su vez, por cadenas de carbohidratos complejos que se caracterizan por su contenido en aminoazúcares y ácidos urónicos unidos a la proteína.

**Pseudogen.** Segmento inactivo de DNA que surge por mutación de un gen activo precursor.

**Transgénico.** Describe la introducción de DNA nuevo en las células germinales por su inyección en el núcleo del huevo.

**Receptor.** Proteína ubicada en la membrana celular con capacidad de unión específica para un ligando, y cuya activación desencadena una serie de procesos metabólicos que conducen a la respuesta celular.

**Recombinación.** Formación de nuevas combinaciones de genes ligados por fenómenos de entrecruzamiento entre sus loci.

**Región intergénica.** fracción de DNA localizada entre dos genes.

**Remanentes.** Partículas de quilomicrones y VLDL resultantes de su hidrólisis por la lipoproteína lipasa.

**Tándem.** Término usado para describir las copias múltiples de la misma secuencia (por ejemplo, DNA) que son adyacentes.

**Secuenciación.** Reacción de amplificación empleada para determinar la secuencia de pares de bases de un DNA determinado.

**Secuencia promotora.** Región de DNA involucrada en la unión de la RNA polimerasa al iniciar la transcripción.

**Sialilación post-traducciona.** Agregación de residuos de ácido siálico a la proteína recién sintetizada.

**Sinusoide.** Región hepática en forma de canal por la que circulan las lipoproteínas plasmáticas y demás moléculas, y que desemboca en la arteria hepática.

**Sulfato de heparán.** El sulfato de heparán está presente en toda la extensión de las superficies celulares como proteoglicanos y es extracelular.

**Tag DNA polimerasa.** DNA polimerasa obtenida de *Thermophilus aquaticus*, la cual es resistente a altas temperaturas y se emplea en las reacciones de PCR.

**Tau.** Proteína asociada a los microtúbulos cuya función normal es promover y estabilizar el ensamblaje de los microtúbulos.

**Xantoma.** Acúmulo de colesterol y ácidos grasos sobre la piel.

## ABREVIATURAS

<b>ACD</b>	Anticoagulante ácido cítrico-dextrosa.
<b>apo A-I</b>	Apolipoproteína tipo A-I.
<b>apo A-II</b>	Apolipoproteína tipo A-II.
<b>apo A-IV</b>	Apolipoproteína tipo A-IV.
<b>apo B-48</b>	Apolipoproteína tipo B-48.
<b>apo B-100</b>	Apolipoproteína tipo B-100.
<b>apo C-I</b>	Apolipoproteína tipo C-I.
<b>apo C-II</b>	Apolipoproteína tipo C-II.
<b>apo D</b>	Apolipoproteína tipo D.
<b>apo E</b>	Apolipoproteína tipo E.
<b>APO E</b>	Gen de la apolipoproteína E.
<b>APO E-ε4</b>	Alelo 4 del gen de la apolipoproteína E.
<b>apo-VLDL</b>	Apolipoproteína unida a lipoproteína de muy baja densidad.
<b>APP</b>	Proteína precursora del amiloide (del inglés amyloid precursor protein).
<b>Arg 142→Cys</b>	Sustitución de un aminoácido arginina por una cisteína en el residuo 142.
<b>Arg 145→Cys</b>	Sustitución de un aminoácido arginina por una cisteína en el residuo 145.
<b>CETP</b>	Proteína transportadora de ésteres de colesterol.
<b>dATP</b>	Desoxi-adenosín-trifosfato.
<b>dCTP</b>	Desoxi-citidín-trifosfato.
<b>dGTP</b>	Desoxi-guanosín-trifosfato.
<b>dTTP</b>	Desoxi-timidín-trifosfato.
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico.
<b>cd.vA</b>	Acido desoxirribonucleico complementario.
<b>DNTPs</b>	Desoxi-nucleótido-trifosfatos.
<b>E-2/2</b>	Genotipo homocigoto para el alelo ε2 de la apolipoproteína E.
<b>E-3/2</b>	Genotipo heterocigoto que involucra los alelos ε3 y ε2 de la apolipoproteína E.
<b>E-3/3</b>	Genotipo homocigoto para el alelo ε3 de la apolipoproteína E.
<b>E-4/3</b>	Genotipo heterocigoto que involucra los alelos ε4 y ε3 de la apolipoproteína E.
<b>E-4/4</b>	Genotipo homocigoto para el alelo ε4 de la apolipoproteína E.
<b>E-4/2</b>	Genotipo heterocigoto que involucra los alelos ε4 y ε2 de la apolipoproteína E.
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer.
<b>EAE</b>	Enfermedad de Alzheimer esporádica.

<b>EAF</b>	Enfermedad de Alzheimer familiar.
<b>F4</b>	Oligonucleótido que flanquea al gen APO E en dirección 5'→3'
<b>F6</b>	Oligonucleótido que flanquea al gen APO E en dirección 5'→3'
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad.
<b>α-HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad con movilidad electroforética α.
<b>HDL<sub>2</sub></b>	Partícula grande de lipoproteína de alta densidad.
<b>HDL<sub>3</sub></b>	Partícula pequeña de lipoproteína de alta densidad.
<b>Hep G2</b>	Línea celular de carcinoma hepático.
<b>Hha I</b>	Endonucleasa de restricción extraída de <i>Haemophilus haemolyticus</i> .
<b>HSPG</b>	Proteoglicanos de heparán sulfato.
<b>IDL</b>	Lipoproteína de densidad intermedia.
<b>kb</b>	kilobases.
<b>kDa</b>	kilo Daltons.
<b>LCAT</b>	Lecitín:colesterol acil transferasa.
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo.
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad.
<b>LPL</b>	Lipoprotein lipasa.
<b>LRP</b>	Proteína relacionada a las lipoproteínas, o Proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad.
<b>Lys 146→Glu</b>	Sustitución de un aminoácido lisina por ácido glutámico en el residuo 146.
<b>mA</b>	Miliampers.
<b>M<sub>r</sub></b>	Masa molecular relativa expresada en Daltons.
<b>M1</b>	Marcador de peso molecular número 1.
<b>M2</b>	Marcador de peso molecular número 2.
<b>ng/μl</b>	Nanogramos por microlitro.
<b>PAM</b>	Proteína asociada a los microtúbulos.
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PHFs</b>	Pares de filamentos helicoidales.
<b>PPA</b>	Proteína precursora del amiloide.
<b>pre-β-HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad con movilidad pre-β.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico.
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>mRNA apo E</b>	Ácido ribonucleico mensajero de apolipoproteína E.
<b>S<sub>r</sub></b>	Índice de flotación. Unidades Svedberg de flotación.
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central.
<b>U/μl</b>	Unidades por microlitro.
<b>UV</b>	Luz ultravioleta.
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad.
<b>β-VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad con movilidad β, o bien, Partículas remanentes de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad.

## RESUMEN

*La apolipoproteína E es una proteína constituyente de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de los quilomicrones, que son lipoproteínas sintetizadas en hígado e intestino delgado respectivamente, para transportar el colesterol y los triglicéridos a todas las células de los tejidos.*

*La apolipoproteína E (apo E) es codificada por el gen APO E que se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.2 y es altamente polimórfico. Consta de 3.7 kb y está ligado a los genes apo C-I, C-I' (pseudogen) y C-II, e incluye 4 exones.*

*El gen APO E tiene 3 alelos diferentes denominados  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$  y  $\epsilon_4$ , que codifican para tres isoformas referidas como E2, E3 y E4, que difieren entre sí por la sola sustitución de un aminoácido, misma que le confiere a cada isoforma características específicas.*

*La apo E interviene activamente en el metabolismo de remanentes de quilomicrones y VLDL ya que estas lipoproteínas son catabolizadas por las células de diferentes tejidos, vía interacción de la apo E con los receptores LDL y receptores para apo B-100.*

*Una isoforma mutante de apo E (E-2/2) está directamente relacionada con Hiperlipoproteinemia tipo III, la cual tiene como características principales: la hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia; incremento en la permanencia de  $\beta$ -VLDL debido a que la apo E2 mutante interacciona poco o nada con su receptor.*

*Además de ser el mediador entre lipoproteínas y receptores, la apo E tiene un papel importante en la regeneración del tejido nervioso, principalmente cuando existe daño del tejido; se le atribuye también cierta participación en la respuesta inmune y en algunas alteraciones cardíacas como la aterosclerosis.*

*Recientemente se ha descubierto que la apo E está relacionada con la enfermedad de Alzheimer y la proteína  $\beta$ -amiloide, que es la proteína presente en las placas neuríticas observadas en cerebros de pacientes estudiados post-mortem.*

*Se han realizado varios estudios en diferentes poblaciones del mundo encontrando que para la mayoría de las poblaciones estudiadas, la frecuencia del alelo  $\epsilon_3$  es mucho mayor que la frecuencia de los alelos  $\epsilon_4$  y  $\epsilon_2$ .*

*Como el alelo  $\epsilon_4$  de la apo E se ha considerado como un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer, y como no se conoce la frecuencia de los haplotipos en la población mexicana, se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de la apo E en la población mexicana normal para establecer los patrones normales de la apo E en nuestra población.*

*El alelo  $\epsilon_3$  resultó ser el más frecuente en la población mexicana, predominando el haplotipo E-3/3, siendo similar a lo reportado para otras poblaciones, mientras que el alelo  $\epsilon_4$  es el menos frecuente.*

*Este trabajo es parte de un proyecto de investigación sobre la enfermedad de Alzheimer, por lo que los resultados obtenidos serán de gran utilidad para compararlos con las frecuencias genotípicas de los pacientes con Alzheimer y poder establecer la relación de la apo E con esta enfermedad en la población mexicana.*



## **I. INTRODUCCION**

## 1.1. Antecedentes.

Después de los esfuerzos por aislar las proteínas del plasma humano durante la Segunda Guerra Mundial, fueron claramente identificadas las lipoproteínas de baja densidad (LDL) con movilidad electroforética  $\beta$  y separadas de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) con movilidad  $\alpha$  (Havel y Kane, 1995).

En la siguiente década, se demostró que las determinantes antigénicas de las lipoproteínas  $\alpha$  y  $\beta$  son distintas. Estudios de su comportamiento hidrodinámico demostraron la existencia de las grandes y poco densas lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL); con esto se estableció que una proteína fuertemente antigénica es común para estas lipoproteínas y las LDL (Havel y Kane, 1995).

La alteración lipoproteica conocida como hiperlipoproteinemia tipo III se describió en 1950, y originalmente se le nombró "xantoma tuberosum", debido a la presencia de lesiones xantomatosas de la piel sobre los tendones extensores y xantomas planos en el dorso de las manos; además, se caracterizó por altas concentraciones de lipoproteínas VLDL, IDL, y LDL (Mahley y Rall, 1995).

Fredrickson y cols. en 1967, mediante la combinación de ultracentrifugación y electroforesis en papel, encontraron que un grupo de pacientes tenía una fracción VLDL con movilidad  $\beta$ , menor que la movilidad normal pre- $\beta$ ; éstas lipoproteínas fueron referidas como  $\beta$ -VLDL (Fredrickson, 1967).

Shore y Shore fueron los primeros en identificar a la apolipoproteína E, inicialmente llamada "apoproteína rica en arginina", como una proteína constituyente de las VLDL (Shore, 1973).

En 1973 Havel y Kane demostraron que los sujetos con hiperlipoproteinemia tipo III tienen aumento absoluto en los niveles plasmáticos de apo E, (apoproteína rica en arginina), una de las varias proteínas componentes de  $\beta$ -VLDL ricas en apo-E2 y ciertas subclases de HDL (Havel, 1973; Mahley, 1988).

En 1975, Utermann y cols. demostraron, por isoelectroenfoque, que una isoforma particular de apo E estuvo ausente invariablemente en sujetos con hiperlipoproteinemia tipo III. Estas observaciones sugirieron que el defecto genético primario en hiperlipoproteinemia tipo III era homocigosidad para una isoforma mutante de apo E (Utermann y Vogelberg, 1979; Utermann y Pruin, 1979).

La genética y el modo de herencia de apo E, descritos primero por Utermann y cols. y referidos después por Zannis y Breslow, fueron las bases para entender el polimorfismo de apo E y establecer la asociación de la apo E mutante con la hiperlipoproteinemia tipo III (Zannis y Breslow, 1981; Zannis y Just, 1981).

En 1985 los estudios de Mahley y cols. establecieron las diferencias estructurales en las secuencias de aminoácidos entre varias isoformas de apo E y definieron, a nivel molecular, el papel de la forma mutante apo E en el desarrollo de hiperlipoproteinemia tipo III (Weisgraber, 1981; Rall, Weisgraber e Innerarity, 1982; Rall, Weisgraber y Mahley, 1982; Mahley, 1991).

Zannis y Breslow, usando una técnica electroforética bidimensional, hicieron dos observaciones importantes que ayudaron a clarificar el polimorfismo de apo E. Encontraron dos tipos de polimorfismo de apo E, uno determinado genéticamente y otro no. El último resultó ser el producto de una sialilación post-traducciona del polipéptido de apo E, originando una o varias isoformas ácidas (Zannis y Breslow, 1981; Zannis y Just, 1981).

Las bases moleculares del polimorfismo de apo E fueron establecidas por Mahley y cols., quienes determinaron la estructura primaria de apo E y encontraron que las isoformas E4, E3, y E2, difieren entre sí por la sola sustitución de un aminoácido en dos sitios de la proteína (Weisgraber, 1981; Rall, Weisgraber e Innerarity, 1982; Rall, Weisgraber y Mahley, 1982; Mahley, 1991).

En 1988 se llevó a cabo el descubrimiento del gen APO E, que se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.2 y es altamente polimórfico (Mahley, 1988).

En ese año, Sing y Davignon hallaron que los alelos  $\epsilon 4$  y  $\epsilon 2$  tienen efectos significantes en varios parámetros de lípidos y lipoproteínas. Mientras que el alelo  $\epsilon 3$  no muestra desviaciones para la población (Sing, 1985).

En 1993 Fazio y cols. demostraron que un ratón transgénico expresó una forma mutante de apo E (Arg 142  $\rightarrow$  Cys) que se une a su receptor defectuosamente, además de tener marcada hiperlipidemia y acumulación de  $\beta$ -VLDL en plasma (Fazio, 1993).

Herz y cols. clonaron un cDNA para una proteína de 600 kDa, el LRP, que tiene marcada homología estructural con el receptor LDL (Herz, 1988).

En 1993 Strittmatter y cols., demostraron la asociación del alelo APOE- $\epsilon 4$  y la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (Strittmatter, 1993).

La producción y el acúmulo de apo E aumentan significativamente en alteraciones del Sistema Nervioso Central (SNC) y los nervios periféricos dañados (Mahley, 1995; Mahley, 1988).

Kontula y cols. en 1990, describieron una técnica simplificada para el estudio del DNA que requiere de la reacción en cadena de la polimerasa (P.C.T.) para la amplificación del DNA en la región del gen apo E y digestión con una endonucleasa de restricción (Kontula, 1990).

Hixson y Vernier, emplearon los oligonucleótidos F4 y F6 para amplificar el gen APO E y el producto amplificado fué digerido con la enzima de restricción Hha I que identifica una secuencia de 4 pares de bases (GCGC), generando un patrón de bandas específico para cada isoforma de apo E ( $\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3$ , y  $\epsilon 2$ ) (Hixson y Vernier, 1990).

## ***1.2. Digestión, Movilización y Transporte de Ácidos Grasos.***

Las células que derivan su energía de la oxidación de los ácidos grasos, pueden obtener los ácidos grasos de tres fuentes: las grasas de la dieta, las grasas almacenadas en las células como gotas lipídicas y (en animales) las grasas recién sintetizadas en un órgano para ser exportadas a otro órgano (Lehninger, 1993).

Los triacilgliceroles proveen más de la mitad de la energía requerida por algunos órganos, particularmente el hígado, corazón y músculo esquelético (Lehninger, 1993).

Antes de que los triglicéridos ingeridos puedan ser absorbidos através de la pared intestinal, deben ser convertidos a partículas grasas macroscópicas insolubles que se dispersan al interior en micelas microscópicas. Las sales biliares, tales como el ácido taurocólico, son sintetizadas a partir de colesterol en el hígado, almacenados en la vesícula biliar, y liberados al intestino delgado después de la ingesta de grasas. Estos compuestos actúan como detergentes biológicos, convirtiendo las grasas de la dieta en micelas mixtas de sales biliares y triacilgliceroles (Figura 1, paso 1). La formación de micelas aumenta enormemente la fracción de moléculas lipídicas accesibles para la acción de las lipasas hidrosolubles en el intestino, y la acción de la lipasa convierte a los triacilgliceroles en monoacilgliceroles y diacilgliceroles, ácidos grasos libres y glicerol (paso 2). Estos productos difunden en las células epiteliales del intestino (mucosa intestinal) (paso 3), donde son reconvertidos a triacilgliceroles y empaquetados con el colesterol de la dieta y proteínas específicas en agregados lipoprotéicos llamados quilomicrones (paso 4) (Lehninger, 1993).

Las apolipoproteínas son proteínas unidas a lípidos, responsables del transporte de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol entre los órganos. Las apolipoproteínas (designadas "apo" cuando están en su forma libre de lípidos) se combinan con varios lípidos para formar varias clases de lipoproteínas. Las proteínas de las lipoproteínas actúan como puntos de reconocimiento específico para receptores en la superficie celular. En la captación de lípidos por el intestino (figura 1), los quilomicrones, que contienen apoproteína C-II (apo C-II), se mueven de la mucosa intestinal al interior del sistema linfático, através del cual entran a la sangre y son transportados hacia el músculo y tejido adiposo (paso 5) (Lehninger, 1993). En los capilares de esos tejidos, la enzima extracelular lipoprotein lipasa es activada por apo C-II. Esta enzima hidroliza los triacilgliceroles a ácidos grasos y glicerol (paso 6), que son captados por las células en los tejidos blanco (paso 7). En músculo, los ácidos grasos son oxidados para obtener energía; en el tejido adiposo, son reesterificados para almacenarlos como triglicéridos (paso 8) (Lehninger, 1993).

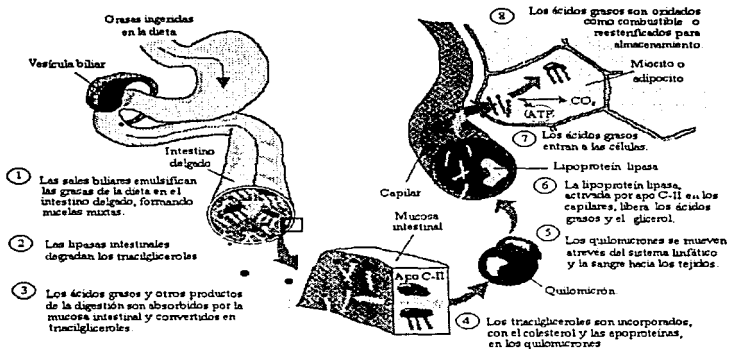


Figura 1. Digestión de las grasas, absorción de los ácidos grasos en el intestino delgado y transporte de lípidos hacia músculo y tejido adiposo (Lehninger, 1993).

### I.3. Lipoproteínas.

#### I.3.1. Composición y aspectos estructurales de las lipoproteínas.

Las lipoproteínas plasmáticas son complejos multicomponentes de proteínas y lípidos que forman agregados moleculares distintos entre sí (Lehninger, 1993; Devlin, 1993); varían extensamente en tamaño, pero virtualmente todas parecen ser microemulsiones (Lehninger, 1993). Son partículas esféricas con un centro a base de lípidos no polares (principalmente triglicéridos y ésteres de colesterol) y una superficie de lípidos polares en monocapa (principalmente fosfolípidos) y apoproteínas. El colesterol no esterificado también está presente en la superficie, pero en partículas más grandes que se distribuyen progresivamente al interior, (figura 2) (Havel y Kane, 1995).

Muchas proteínas componentes de la superficie, como los fosfolípidos, tienen propiedades anfipáticas. Estas propiedades son proporcionadas por regiones que contienen residuos aminoácidos tanto polares como no polares, que son distribuidos en lados opuestos de una  $\alpha$ -hélice (Havel y Kane, 1995).

La asociación de los lípidos polares y proteínas con lipoproteínas es mediada por fuerzas hidrofóbicas con lo cual las cadenas de acil grasos y los lados aminoácidos no polares de las cadenas son excluidos del medio acuoso (Havel y Kane, 1995).

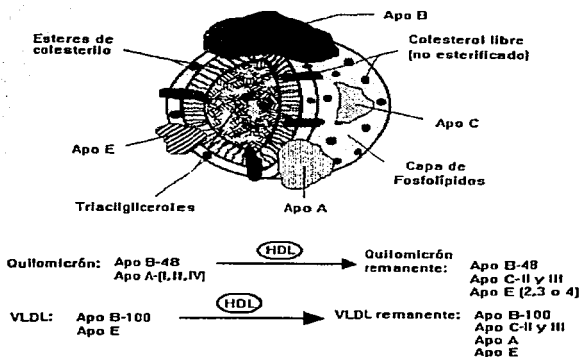


Figura 2. Estructura molecular de una lipoproteína. Los quilomicrones y VLDL nacientes adquieren las apoproteínas C-II, C-III y E al convertirse en remanentes durante los procesos metabólicos.

### 1.3.2. Clasificación de las lipoproteínas.

Las lipoproteínas pueden clasificarse con base en su densidad (como se determinó por ultracentrifugación); pueden identificarse además por electroforesis (Lehninger, 1993; Devlin, 1993).

La densidad de las lipoproteínas está inversamente relacionada a su tamaño. Basados en la densidad y en ciertas propiedades composicionales y funcionales, las lipoproteínas son usualmente separadas en seis clases (Tabla 1). Dos grandes clases contienen principalmente triglicéridos en sus núcleos. Estos son: los quilomicrones, secretados por los enterocitos, en que la apoproteína B es principalmente o exclusivamente apo B-48 y las VLDL, secretadas por los hepatocitos, que contienen apo

B-100. Las clases pequeñas de lipoproteínas, LDL, HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>, contienen principalmente ésteres de colesterol en sus núcleos ( Havel y Kane, 1995).

Tabla 1. Propiedades físicas de las diferentes clases de lipoproteínas del plasma humano.

Clase	Densidad (g/ml)	Movilidad electroforética	Diámetro (nm)	Peso Molecular
Quilomicrones	0.93	Permanecen en el origen	75-1200	50-1000 x 10 <sup>6</sup>
VLDL	0.93-1.006	Pre-β-lipoproteínas	30-80	10-80 x 10 <sup>6</sup>
IDL	1.006-1.019	Pre-β-lipoproteína lenta	25-35	5-10 x 10 <sup>6</sup>
LDL	1.019-1.063	β-lipoproteínas	18-25	2,300,000
HDL <sub>1</sub>	1.063-1.125	α-lipoproteínas	9-12	360,000
HDL <sub>2</sub>	1.125-1.210	α-lipoproteínas	5-9	175,000
Lp(a)	1.04-1.090	Pre-β-lipoproteína lenta	25-30	~ 2,800,000

Fuente: Havel y Kane, 1995.

Las formas maduras de estas partículas no son secretadas directamente por las células, pero sí se producen a través de procesos metabólicos en el plasma sanguíneo. Las LDL son los productos finales del metabolismo de las VLDL. Los componentes de HDL son secretados con los quilomicrones y los VLDL, y también como precursores de HDL independientemente. La sexta clase, IDL, que contiene cantidades apreciables de triglicéridos y ésteres de colesterol en sus núcleos, se produce durante la conversión de VLDL a LDL. Una séptima clase, la lipoproteína Lp(a), está presente en cantidades variables en el plasma. Está compuesta de una partícula de LDL unida vía un grupo disulfuro a una gran glicoproteína polimórfica, apo (a) ( Havel y Kane, 1995).

En ciertos estados patológicos, se han encontrado lipoproteínas con estructura diferente, denominadas lipoproteínas laminares. Estas partículas tienen un centro no polar y están compuestas de una bicapa de lípidos y proteínas, como una membrana celular.

La composición de las principales clases de lipoproteínas se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Composición química de las lipoproteínas plasmáticas normales en humano.

	Componentes de superficie			Centro lipídico	
	Coolesterol	Fosfolípidos	Apolipoproteínas	Triglicéridos	Ester de coolesterol
Quilomicrones	2	7	2	86	3
VLDL	7	18	8	55	12
IDL	9	19	19	23	29
LDL	8	22	22	6	42
HDL <sub>2</sub>	5	33	40	5	17
HDL <sub>1</sub>	4	35	55	3	13

Fuente: Havel y Kane, 1995.

### I.3.3. Genética de las apolipoproteínas.

Muchas de las apolipoproteínas poseen muchas regiones helicoidales anfipáticas repetidas (apoproteínas A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E). Estas proteínas pertenecen a una familia multigénica en que las regiones codificantes están compuestas de repetidos en tandem de 11 codones, indicando que esos genes se desarrollan por medio de duplicaciones de un gen primordial. Algunas de las proteínas, sin embargo, no pertenecen a esta familia y contienen pocas hélices anfipáticas.

Las apoproteínas B (B-100 y B-48), que son las apolipoproteínas más grandes y son el producto de un sólo gen, evidentemente derivan su lipofiliencia en gran parte por extensos residuos aminoácidos hidrofóbicos y estructura anfipática  $\beta$  (Havel y Kane, 1995).

Las LDL poseen una apolipoproteína única rica en ácido glutámico; en HDL, sus principales proteínas también tienen ácido glutámico; y en VLDL, existen cantidades mayores de ácido glutámico en sus apolipoproteínas. Esta observación da soporte químico al concepto de que una proteína es capaz de diferenciar a las lipoproteínas entre sí.

Esta proteína fué denominada "apolipoproteína (apo) B", y es el constituyente común de LDL, que se distingue de la proteína HDL (apo A-I y bajas concentraciones de apo A-II, apo A-IV y apo D); y de la encontrada en las VLDL (apo C) e IDL (Lehninger, 1993).

Con excepción de las apoproteínas B, las apoproteínas junto con el coolesterol no esterificado, tienen apreciable solubilidad en agua y pueden intercambiarse rápidamente entre partículas lipoproteínicas o con otras superficies lipídicas. Los fosfolípidos y los lípidos no polares tienen un potencial de intercambio pequeño, pero pueden ser transferidos entre lipoproteínas por proteínas de transferencia específica. El fracaso de apo B para transferirse entre las lipoproteínas se relaciona con el gran número de aminoácidos no polares en las cadenas que penetran en la superficie de la monocapa lipídica (Havel y Kane, 1995).



### I.3.4. Características de las apolipoproteínas y su relación con las lipoproteínas.

Algunas propiedades de las apolipoproteínas, así como su origen y distribución en las lipoproteínas del plasma se resumen en la tabla 3.

Se observa que las apolipoproteínas A se encuentran predominantemente en HDL, de las cuales la apo A-I se encuentra en mayor concentración en plasma e interviene en la activación de la lecitina:colesterol acil transferasa (LCAT). Las tres formas de apo A poseen un peso molecular intermedio, siendo apo A-II la de menor peso y es sintetizada por hígado e intestino.

Las apolipoproteínas de mayor peso molecular son las apo B-48 y B-100, sintetizadas por intestino e hígado respectivamente y asociadas de la misma manera a quilomicrones y VLDL. La apo B-100 es la mayor apolipoproteína y está asociada exclusivamente a LDL. La interacción de las lipoproteínas con el receptor LDL es dirigida por apo B-100.

Tabla 3. Características de las apolipoproteínas plasmáticas en humanos normales.

<i>Apolipoproteínas</i>	<i>Concentración en plasma (mg/dl)</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>Asociación con lipoproteínas</i>	<i>Fuente</i>	<i>Función</i>
Apo A-I	130	28,331	HDL		Activación de LCAT
Apo A-II	40	17,380	HDL	Hígado e intestino	
Apo A-IV		44,465	Q, HDL		
Apo B-48	< 1	241,000	Q	Intestino	
Apo B-100	80	513,000	VLDL, LDL, IDL	Hígado	Unión al receptor LDL
Apo C-I	6	7,000	VLDL, HDL, IDL		
Apo C-II	3	8,900	Q, VLDL, HDL, IDL	Hígado	Activación de LPL
Apo C-III	12	8,800	Q, VLDL, HDL, LDL, IDL		Inhibición de LPL
Apo D	10	19,000	HDL	Varios	
Apo E-II	5	34,145	Q, VLDL, HDL, LDL, IDL	Hígado	Dispara la captación celular de VLDL y quilomicrones remanentes
Apo E-III					
Apo E-IV					

Q: Quilomicrón; VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad; HDL: Lipoproteína de alta densidad; LDL: Lipoproteína de baja densidad; IDL: Lipoproteína de densidad intermedia; LCAT: Lecitina-colesterol acil transferasa; LPL: Lipoprotein lipasa.

Las apolipoproteínas C-II y C-III se unen tanto a quilomicrones como a VLDL, y están relacionadas directamente con la actividad de la lipoprotein lipasa (LPL), apo C-II activa a LPL mientras que apo C-III la inhibe.

Las tres isoformas de apolipoproteína E, unidas a quilomicrones y VLDL remanentes, son los mediadores de la interacción de las lipoproteínas con las células de los diferentes tejidos involucrados en la captación de remanentes. Existen variaciones metabólicas relacionadas a estas apolipoproteínas y el papel que desempeñan en el metabolismo de los lípidos, las que se explican más adelante.

### 1.3.5. Principales enzimas que participan en el transporte de lípidos por las lipoproteínas.

Existen 3 enzimas muy importantes en el transporte de lípidos: lipoprotein lipasa, lipasa hepática y lecitín:colesterol acil transferasa (LCAT) (Tabla 4). La lipoprotein lipasa y la lipasa hepática son miembros de una familia multigénica que incluye la lipasa pancreática. La lipoprotein lipasa se sintetiza en varios tejidos, pero principalmente en tejido adiposo y músculo estriado. La enzima es sintetizada en las células del tejido parenquimial, es secretada y transportada al endotelio de los vasos sanguíneos, donde se une al sulfato de heparán. La lipoprotein lipasa se requiere para la hidrólisis eficiente de triglicéridos en quilomicrones y muchas partículas VLDL. Su acción requiere la presencia de una proteína activadora, apo C-II (Utermann y Vogelberg, 1979), sobre la superficie de la lipoproteína. En tejido adiposo, la actividad de la enzima es inducida por la insulina y aumenta en condiciones anabólicas. En músculo, particularmente músculo esquelético y músculo cardíaco, la actividad permanece alta o se incrementa bajo condiciones catabólicas (Lehninger, 1993).

Tabla 4. Enzimas clave del transporte de lípidos en plasma.

Enzima	Peso Molecular	Mayor tejido productor	Substratos
Lipoprotein lipasa	50,394	Tejido adiposo (adipocitos) Músculo estriado	Triglicéridos y fosfolípidos de quilomicrones y grandes VLDL
Lipasa hepática	53,222	Hígado (hepatocitos)	Triglicéridos y fosfolípidos de VLDL pequeños, IDL, y grandes HDL
Lecitín:colesterol aciltransferasa	47,090	Hígado	Colesterol y fosfatidilcolina de especies HDL

Fuente: Havel y Kane, 1995.

La lipasa hepática se parece a la lipoproteína lipasa en que actúan en las superficies celulares, presumiblemente uniéndose al heparán sulfato. Es sintetizada por los hepatocitos y transportada a las células del endotelio hepático y probablemente a las células endoteliales en tejido adrenal y gonadal (Doolittle, 1987). Su función no es tan conocida como la de la lipoproteína lipasa pero parece que participa en la lipólisis de las VLDL e IDL durante los subsecuentes estados de formación de LDL y en la hidrólisis de fosfolípidos y triglicéridos en HDL. Su actividad aumenta con los andrógenos y disminuye con los estrógenos.

LCAT es responsable de la síntesis de muchos ésteres de colesterol en las lipoproteínas del plasma. LCAT es sintetizado por los hepatocitos y secretado a la sangre, donde actúa sobre especies de HDL para producir colesterol esterificado con residuos de ácil grasos de fosfatidilcolina (lecitina) (Havel y Kane, 1995).

### L3.6. Receptores de lipoproteínas.

El catabolismo terminal de las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B se lleva a cabo por endocitosis mediada por un receptor. El mecanismo del catabolismo terminal de HDL está poco entendido. El receptor mejor estudiado es el receptor LDL, que es una proteína transmembranaral que media la endocitosis de partículas que contienen apo B-100 (VLDL, IDL, y LDL parcialmente catabolizados). Las lipoproteínas se unen al receptor vía apo B-100 o apo E (Mahley, 1983) y son endocitados por invaginación de la membrana plasmática (Havel y Kane, 1995). Una vez que la partícula se une al receptor LDL sobre la membrana plasmática, en sitios que contienen cavidades cubiertas con una proteína llamada clatrina; las lipoproteínas cargadas de colesterol son endocitadas en forma de vesículas cubiertas de clatrina. Intracelularmente, la vesícula cubierta pierde su clatrina y se convierte en un endosoma. El siguiente paso involucra la fusión del endosoma con un lisosoma que contiene numerosas enzimas hidrolíticas, incluyendo proteasas y colesterol esterasas (Lehninger, 1993). Dentro del lisosoma el éster de colesterol componente de LDL es hidrolizado por la colesterol esterasa lisosomal para producir colesterol libre y una molécula de ácido graso de cadena larga (Lehninger, 1993). El receptor se separa del compartimento prelisosomal y es reciclado a la superficie membranaral para otro evento de endocitosis. El receptor está presente principalmente en células endoteliales y en macrófagos que participan en el metabolismo normal de las lipoproteínas plasmáticas (Havel y Kane, 1995).

### L3.7. Metabolismo de las lipoproteínas.

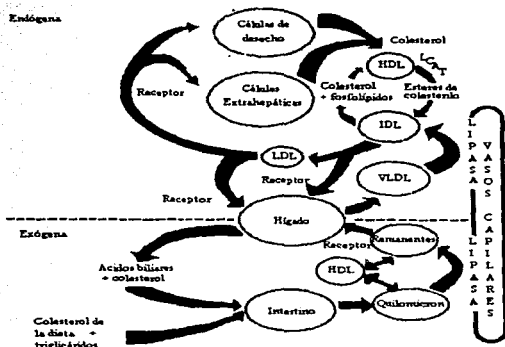


Figura 3. Vías endógena y exógena del metabolismo de las lipoproteínas. (Havel y Kane, 1995).

La apo E participa en las 3 vías involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas (Mahley, 1983) (figura 3): transporte de los lípidos de la dieta desde el intestino hasta el hígado (vía exógena) (Havel y Kane, 1995; Walden, 1994), transporte de lípidos desde el hígado hasta las células extrahepáticas (vía endógena) (Havel y Kane, 1995; Walden, 1994), y transporte de coolesterol desde las células extrahepáticas hasta el hígado (transporte de coolesterol inverso) (Havel y Kane, 1995). El quilomicrón es el principal protagonista de la vía exógena del metabolismo de las lipoproteínas, así como las VLDL lo son en la vía endógena del metabolismo.

Las HDL sirven de vehículo para transportar el coolesterol en exceso de los tejidos extrahepáticos al hígado por medio del transporte de coolesterol inverso.

### **L3.7.1. Biosíntesis y catabolismo de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B.**

Los quilomicrones y VLDL son sintetizados y ensamblados en el retículo endoplásmico de los enterocitos y hepatocitos respectivamente, son transportados al aparato de Golgi, donde las lipoproteínas nacientes son empaquetadas en vesículas secretoras y liberadas en el espacio extracelular por exocitosis (Fainaru, 1982).

Los quilomicrones atraviesan las vellosidades intestinales y las VLDL pasan através de la ventana del endotelio sinusoidal hepático a la sangre (Havel y Kane, 1995).

Los quilomicrones nacientes contienen ácidos grasos recientemente absorbidos como triglicéridos. Sus proteínas constituyentes, sintetizadas en los enterocitos, incluyen apo B-48 y las apoproteínas A (A-I, A-II, y A-IV). Después de la secreción, adquieren apoproteínas C y apo E por transferencia de las HDL (Figura 2). Los quilomicrones, liberados vía ducto torácico en la sangre, se unen a la lipoprotein lipasa en la superficie de las células del endotelio capilar, donde muchos de los triglicéridos son rápidamente hidrolizados junto con algunos glicerofosfátidos de superficie. Concomitantemente, algunos fosfolípidos y las apoproteínas A son transferidos a HDL. Con estos cambios, las partículas pierden gradualmente su afinidad para apolipoproteínas C, que también son transferidas a HDL: la partícula residual ahora llamada "quilomicrón remanente", ha perdido de un 80 a 90% de sus triglicéridos liberados a la sangre (Figuras 3 y 4). Los remanentes se unen a los receptores en los hepatocitos incluyendo receptores LDL (Borensztajn, 1988) donde, luego de la endocitosis, todos los componentes de la partícula son hidrolizados por los lisosomas. Durante el primer paso del metabolismo del quilomicrón en el tejido extrahepático muchos de los triglicéridos entran a los adipocitos para almacenamiento de las células de otros tejidos para su oxidación. Además, algunos de los ácidos grasos liberados se unen a la albúmina plasmática y son transportados a varios tejidos, incluyendo el hígado. Durante el segundo paso del metabolismo del quilomicrón, los triglicéridos residuales y virtualmente todo el colesterol de la dieta son liberados a los hepatocitos. El colesterol que liberan los lisosomas en los hepatocitos puede entrar a rutas de síntesis de ácidos biliares, ser secretado en la bilis como tal, ser incorporado a lipoproteínas nacientes, o ser esterificado con una larga cadena de ácido graso y almacenado en gotas lipídicas dentro de la célula (Havel y Kane, 1995; Lehninger, 1993).

Las VLDL proveen una ruta de exportación para los hepatocitos de los triglicéridos en exceso, que pueden ser almacenados en las células. Cuando entran en la sangre, los VLDL nacientes contienen apo B-100 recién sintetizada y pequeñas cantidades de apo E y apo C. Cantidades adicionales de las últimas proteínas son agregadas después de la secreción, como en el caso de los quilomicrones nacientes (Figura 5). Después, la fase inicial del metabolismo es igual a la de los quilomicrones: hidrólisis por la lipoprotein lipasa y la formación de VLDL remanentes. La razón de hidrólisis de los triglicéridos de VLDL es más lenta que los triglicéridos de los quilomicrones (Havel y Kane, 1995).

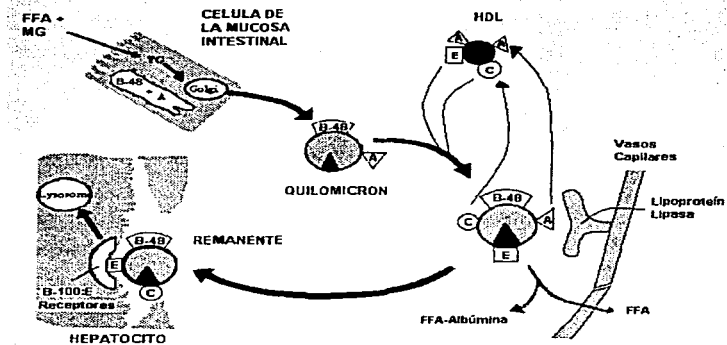


Figura 4. Metabolismo de los quilomicrones. FFA: ácidos grasos libres, MG: monoglicéridos, TG: triglicéridos; A, B, C, E: apolipoproteínas (Havel y Kane, 1995).

Las VLDL remanentes interactúan con los receptores LDL sobre los hepatocitos vía apo E (Mahley, 1983). La presencia de varias moléculas de apo E sobre las partículas remanentes da como resultado una elevada afinidad de unión al receptor y la remoción rápida de los remanentes en la sangre. Este es el caso de las grandes VLDL, que tienden a producir grandes remanentes. Las partículas VLDL pequeñas producen pequeños remanentes con pocas moléculas de apo E, estas tienen baja afinidad por los receptores LDL hepáticos y permanecen más tiempo en la sangre. Los remanentes pequeños incluyen partículas que son aisladas como IDL. Muchas de estas partículas son procesadas posteriormente por la lipasa hepática, a formas LDL. Las LDL contienen poco o nada de apo E, pero pueden unirse al receptor LDL monovalentemente vía apo B-100 (Figura 5).

La endocitosis de los quilomicrones remanentes en el hepatocito también es mediada por apo E (Borenstajjn, 1988), como en el caso de las VLDL nacientes, la exposición del dominio de unión de apo E requiere de lipólisis, acompañada por la pérdida de las apoproteínas C. En contraste a la situación con VLDL, las partículas con carencia de apo E (equivalentes a LDL) no se forman durante la lipólisis de los quilomicrones remanentes (Borenstajjn, 1988). Además, la proteína B-48 de los quilomicrones carece del dominio de unión al receptor presente en apo B-100 y consecuentemente no participa en la toma de remanentes en el hígado (Havel y Kane, 1995).

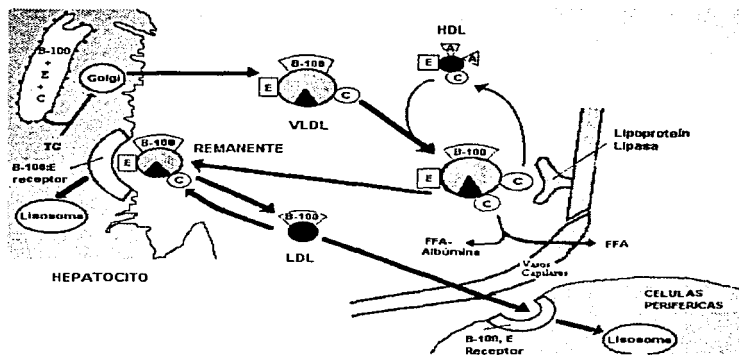


Figura 5. Metabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Havel y Kane, 1995).

### I.3.7.2. Formación de HDL y Transporte de Colesterol en Plasma.

Las apoproteínas A (apo A-I, A-II, y A-IV) son los mayores componentes proteicos de las HDL del plasma. En el intestino, estas proteínas son secretadas primeramente como componentes de los quilomicrones nacientes. Similarmente, también son secretadas por el hígado como componentes de las VLDL nacientes (Figura 3). Algunas apoproteínas de HDL pueden también ser secretadas en formas pobres en lípidos, pero las HDL como tales son ensambladas extracelularmente como componentes de superficie de lipoproteínas ricas en triglicéridos, incluyendo fosfolípidos y colesterol, y ciertas apoproteínas que se disocian durante la lipólisis. Estos componentes son transferidos a HDL preexistentes, donde el colesterol puede ser esterificado por la enzima *Lecitin:colesterol acil transferasa* (LCAT) para producir lisolecitina y éster de colesterol.

La lisolecitina producida por LCAT es transferida a la albúmina y removida en la sangre, mientras que el éster de colesterol es transferido vía *proteína transportadora de ésteres de colesterol* (CETP) entre partículas HDL o de estas a LDL o a lipoproteínas ricas en triglicéridos (Havel y Kane, 1995).

El tamaño de las partículas HDL aumenta según aumente el acúmulo de ésteres de colesterol derivados de LCAT; las lipoproteínas ricas en triglicéridos y las LDL pueden enriquecerse en ésteres de colesterol transferidos de HDL. Los triglicéridos se transfieren recíprocamente de lipoproteínas que contienen apo B a HDL, en que son gradualmente hidrolizados por la lipasa hepática (Figura 3) (Havel y Kane, 1995).

La transferencia de ésteres de colesterol fuera de las HDL por CETP y la hidrólisis de los triglicéridos de HDL por la lipasa hepática reduce el tamaño de HDL. Las grandes partículas HDL se nombran HDL<sub>2</sub>; las partículas pequeñas de HDL se llaman HDL<sub>3</sub> (Havel y Kane, 1995).

El colesterol, como sustrato de LCAT, se deriva no sólo de la superficie de las lipoproteínas del plasma, sino también de las membranas plasmáticas de las células. A diferencia del colesterol del plasma, el colesterol celular es transferido principalmente a especies de HDL pobre en lípidos que contienen solamente apo A-I (pre- $\beta$ -HDL). La transferencia puede ocurrir por difusión pasiva del colesterol en plasma, pero puede ser facilitada por la interacción de apo A-I con la membrana celular (Figura 6) (Havel y Kane, 1995).

La pre- $\beta$ -HDL se asocia con LCAT y CETP y es un sustrato eficiente para la acción de LCAT. Los ésteres de colesterol producidos son transferidos a especies  $\alpha$ -HDL y otras lipoproteínas (Figura 6).

La esterificación de colesterol por LCAT crea un descenso de lipoproteínas y colesterol celular por ser atrapado en los núcleos de las lipoproteínas. El colesterol celular es removido de estas lipoproteínas por el hígado y completa una ruta de *transporte de colesterol inverso* por medio del cual el colesterol en las células extrahepáticas es liberado en la bilis (Figura 6) (Havel y Kane, 1995).

La hidrólisis de los fosfolípidos de HDL por la lipasa hepática, por aumento del potencial químico del colesterol, puede promover la transferencia neta de colesterol de la superficie de HDL al hígado. La actividad de la lipasa hepática es inversamente proporcional a la concentración de HDL en plasma, y esto sugiere que la hidrólisis de fosfatidilcolina de HDL sobre la superficie de las células hepáticas promueve la utilización de los ésteres de colesterol tales como colesterol y lisofosfatidilcolina en el hígado. Finalmente, la pequeña fracción de partículas HDL que contiene apo E puede ser tomada de los hepatocitos vía receptores que reconocen esta proteína. Está claro que apo E tiene un papel importante en la redistribución de lípidos entre varios tejidos en el cuerpo desde sus sitios de síntesis hasta sus sitios de utilización y excreción (Havel y Kane, 1995; Fredrickson, 1967).



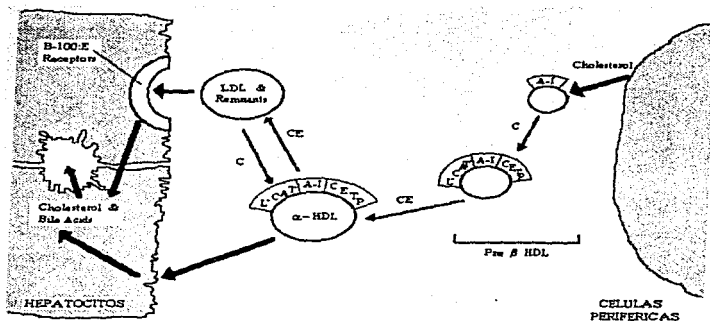


Figura 6. Transporte de colesterol inverso (Havel y Kane, 1995).

#### I.4. Apolipoproteína E.

##### I.4.1. Papel de la Apo E en Hiperlipoproteinemia Tipo III.

La alteración lipoprotéica conocida como hiperlipoproteinemia tipo III fué descrita en los años 50's y originalmente fué llamada "xantoma tuberosum" basándose en la presencia de xantomas en la piel sobre los tendones extensores y xantomas planos en el dorso de las manos. Los pacientes afectados muestran un perfil lipoprotéico anormal determinado por ultracentrifugación caracterizado por un aumento en la concentración de lipoproteínas con índice de flotación de  $S_f = 12$  a 20 (VLDL pequeñas además de IDL) y  $S_f = 0$  a 12 (especialmente LDL) (Mahley, 1995; Mishkel, 1975).

Los pacientes con hiperlipoproteinemia tipo III tienen concentraciones elevadas de colesterol y triglicéridos en plasma (Mahley, 1988; Utermann y Vogelberg, 1979; Mahley, 1991). Una característica bioquímica de la alteración es la presencia de VLDL de migración β (β-VLDL) (Utermann y Vogelberg, 1979) (como lo determinó Fredrickson y cols. en 1967 empleando una combinación de ultracentrifugación y electroforésis en papel) (Fredrickson, 1967) que son remanentes ricos en colesterol de quilomicrones intestinales y VLDL hepáticos (Mishkel, 1975) (figura 7).

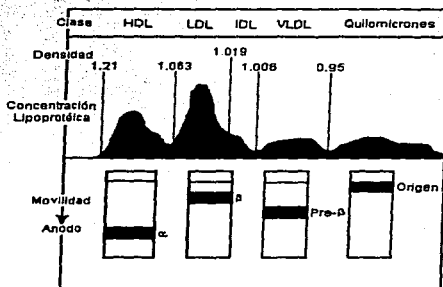


Figura 7. Diferenciación de lipoproteínas por ultracentrifugación y electroforesis en papel (Devlin, 1993).

Las  $\beta$ -VLDL ricas en colesterol fueron el sello distintivo en el diagnóstico de la hiperlipoproteinemia tipo III durante algunos años. En 1973 Havel y Kane demostraron que los sujetos con hiperlipoproteinemia tipo III tienen aumento absoluto en los niveles plasmáticos de apo E. La apo E es una de varias proteínas presentes normalmente en VLDL, quilomicrones, y ciertas subclases de HDL (Havel, 1973; Mahley, 1988). Los factores clínicos de la enfermedad son variados. Muchos sujetos con hiperlipoproteinemia tipo III tienen xantomas cutáneos, particularmente de dos tipos: tuberoeruptivos o xantomas tuberosos y xantomas de los pliegues palmares (xantoma striata palmaris); el último no ha sido identificado en alguna otra alteración. Estos pacientes tienen una alta incidencia de aterosclerosis coronaria prematura y (especialmente) periférica (Mahley, 1991).

Utermann y cols. (Utermann y Vogelberg, 1979; Utermann y Pruin, 1979), demostraron por isoelectroenfoque (figura 8), que una isoforma particular de apo E está ausente invariablemente en sujetos con hiperlipoproteinemia tipo III. Estas observaciones sugirieron que el defecto genético primario en la hiperlipoproteinemia tipo III era la homocigosidad para una isoforma mutante de apo E (referida como apo E-2 para distinguirla de la forma normal apo E-3).

La genética y el modo de herencia de apo E, como lo describió primero Utermann y cols. y referidas después por Zannis y Breslow, permiten entender la asociación de la apo E mutante con la hiperlipoproteinemia tipo III (Zannis y Breslow, 1981; Zannis y Just, 1981).

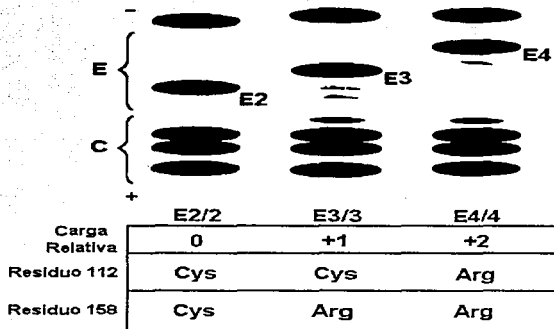


Figura 8. Isoelectrofoerogram de apo-VLDL que muestra los tres fenotipos homocigotos de apo E. También se observan las sustituciones de aminoácidos relacionadas con las diferencias de carga entre las isoformas (Mahley, 1983).

El catabolismo normal de lipoproteínas remanentes, que está dirigido por apo E, se encuentra alterado en este padecimiento. La presencia de la apo E defectuosa da por resultado el acúmulo plasmático de quilomicrones y VLDL remanentes ( $\beta$ -VLDL), que pueden ser tomados por los macrófagos en tejidos periféricos. Como un resultado del depósito masivo del colesterol, estos macrófagos se convierten en células espumosas que pueden ser los progenitores de células cargadas de colesterol en la lesión aterosclerótica (Fainaru, 1982).

En la forma recesiva de la alteración, el desarrollo de hiperlipidemia declarada requiere la herencia de dos alelos para apo E mutante [E-2 (Arg 158 → Cys)]. La presencia de los alelos defectuosos es necesaria pero no usualmente suficiente para inducir la hiperlipoproteinemia tipo III (Mahley, 1995; Mahley, 1988). Muchos sujetos E-2/2 son normolipidémicos o hipocolesterolémicos (Utermann y Pruin, 1979). Así, el desarrollo de la forma recesiva de la hiperlipidemia involucra otros aspectos genéticos, hormonales y/o ambientales que, en combinación con la unión defectuosa al receptor de apo E, precipitan el desarrollo de la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (Walden, 1994). Los factores secundarios incluyen hipotiroidismo, condiciones bajas de estrógenos, obesidad, diabetes, y la edad (Mahley, 1995).

En la forma dominante de la alteración, los individuos poseen un sólo alelo defectuoso de apo E que dispara la hiperlipidemia declarada, presumiblemente al nacimiento. Esas son algunas variantes raras que involucran una sola sustitución de aminoácidos [(Arg 142 → Cys), (Arg 145 → Cys), (Lys 146 → Glu)] o una inserción de siete aminoácidos (residuos 121 a 127 repetidos en tandem). Los factores genéticos, hormonales, y ambientales secundarios no son requeridos para participar en el acúmulo de lipoproteínas remanentes en el plasma, y la presencia de la unión defectuosa al receptor de apo E es suficiente para causar la hiperlipoproteinemia tipo III (Mahley, 1995).

#### **I.4.2. Caracterización Bioquímica de la Apolipoproteína E.**

##### **I.4.2.1. Estructura y Localización del Gen APO E.**

El gen apo E se localiza en el cromosoma 19q13.2 (Hixson y Vernier, 1990; Lehninger, 1993) y es altamente polimórfico (Utermann y Vogelberg, 1979). Este gen tiene una longitud de 3.7 kb y contiene cuatro exones (Das, 1985; Paik, 1985). Está integrado a un gen familiar (figura 9) que contiene los genes para apo C-I, C-I' (pseudogen) y C-II (Mahley, 1983; Jackson, 1984; Yu, 1994). Estudios recientes indican que el gen apo C-II se encuentra aproximadamente a 50 pb del gen apo E en el extremo 3' (Houlston, 1989). La comparación de la estructura del gen apo E con otras seis apolipoproteínas (apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apo C-I, apo C-II, y apo C-III) revela una localización notablemente similar de los intrones y sugiere un origen ancestral común para esta familia de genes (Elshourbagy, 1987).

La secuencia promotora TATAATT se encuentra aproximadamente 30 pb hacia arriba del sitio de iniciación transcripcional (Mahley, 1988; Paik, 1985). También se han identificado otros promotores y elementos potenciadores importantes en la regulación de la biosíntesis de apo E (Mahley, 1988).

El gen APO E tiene tres alelos comunes  $\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3$ , y  $\epsilon 2$ , y estos codifican para tres isoformas principales de apolipoproteína E, que se designan E4, E3, y E2 (Mahley, 1988; Zannis y Breslow, 1982).

Este gen codifica para un mRNA de 1163 nucleótidos (Mahley y Rall, 1995; Das, 1985). El producto de traducción primaria comprende 317 aminoácidos, y en el N-terminal 18 aminoácidos que funcionan como un péptido de señal (Zannis y McPherson, 1984). Así, la apo E madura es secretada como una proteína de 299 aminoácidos con masa relativa (M<sub>r</sub>) de 34,200 (Mahley, 1988; Das, 1985).

El receptor LDL también ha sido mapeado en el cromosoma 19, pero no parece estar ligado a apo E (Francke, 1984).

Diferentes elementos reguladores controlan la expresión del gen apo E en varios tejidos. Simonet y colaboradores han mapeado los elementos reguladores específicos de tejido de la región 5' y 3' del gen apo E, incluyendo los elementos que aparecen hacia abajo en la región intergénica apo E-C-I. Están separados en testículo y riñón, en la región 5' del gen apo E, y en 3' en cerebro, piel y testículo pero hacia arriba del gen apo C-I. El elemento de control en hígado está aproximadamente a 15 kb en el extremo 3' del gen apo E en la región entre el gen apo C-I y el pseudogen apo C-I' (Simonet, 1991).

La estructura secundaria de apo E se muestra en la figura 10. La  $\alpha$ -hélice, la  $\beta$ -pliegada, y los giros- $\beta$  y estructura al azar ocupan un 62%, 9%, 11% y 18% de la proteína, respectivamente. Un aspecto interesante de la estructura de todas las apolipoproteínas es la  $\alpha$ -hélice anfipática, caracterizada por una cara compuesta de residuos apolares y la otra de residuos polares (Mahley, 1988). La marcada consistencia de los estudios realizados sobre la estructura de apo E indican que los aminoácidos básicos arginina y lisina (e histidina) en vecindad a los residuos 140 y 160 son importantes en la mediación de la unión de apo E con el receptor LDL (Mahley, 1988).

#### *1.4.2.2. Estructura y Función de la Apolipoproteína E.*

El principal papel fisiológico de apo E es mediar la interacción de las lipoproteínas con los receptores de lipoproteínas, incluyendo el receptor LDL y uno postulado como remanente de quilomicrones o receptor apo E. El receptor de remanentes aparece ahora como proteína relacionada a los receptores LDL (LRP) (Beisiegel, 1989).

Se ha demostrado que apo E tiene dos dominios estructurales que difieren en su función. El N-terminal es el segundo tercio de apo E (residuos ~1 a 165 aa) y el C-terminal es el primer tercio (residuos ~200 a 299 aa) son conectados por una región (165 a 200 aa) de estructura al azar que sirve como una bisagra entre esos dos dominios altamente estructurales (Figura 10) (Rall, Weisgraber y Mahley, 1982; Weisgraber, 1990). El dominio del C-terminal contiene una fuerte región anfipática  $\alpha$ -hélice que está postulada para representar al dominio de mayor unión lipídica (Mahley, 1988). El dominio del N-terminal contiene la región de apo E responsable de la interacción con el receptor LDL y con la heparina (proteoglicano de sulfato de heparán). Como se discute abajo, el sitio de unión a la heparina y al receptor LDL reside en la vecindad de los aminoácidos 130 a 150, una región rica en aminoácidos básicos (arginina y lisina) (Figura 11) (Wilson, 1991; Mahley, 1979).

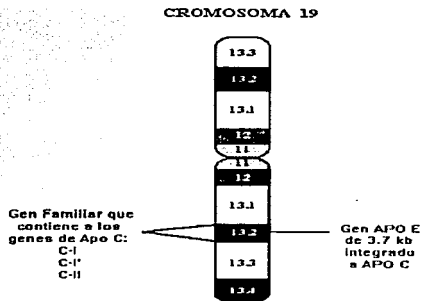


Figura 9. Localización del gen APO E en el cromosoma 19.

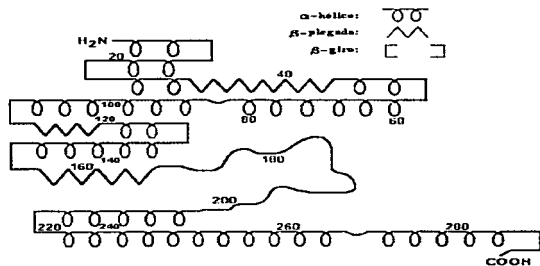


Figura 10. Estructura secundaria de apo E (Mahley, 1988).

El dominio de unión al receptor de la molécula de apo E ha sido mapeado (Mahley, 1984) usando seis acercamientos experimentales complementarios: (1) Modificaciones químicas selectivas de varios aminoácidos estableciendo que un número limitado de residuos arginina y lisina dentro de apo E son críticos en la mediación de la unión al receptor. (2) Identificación y secuenciación de mutantes de apo E naturales que se unen defectuosamente al receptor (a los residuos 136, 142, 145, y 146) estableciendo que la región 136-150 contiene varios residuos arginina y lisina críticos para la unión. (3) Generación de fragmentos de apo E y pruebas de su unión al receptor localizando el dominio de unión a la mitad de la molécula. (4) Mapeo del epítipo de un anticuerpo monoclonal de apo E que bloquea la interacción de apo E con el receptor LDL demostrando que la región 140-150 está involucrada. (5) Los análisis de la actividad de unión al receptor de formas mutantes de apo E producidos por mutagénesis sitio-dirigida revelaron que los residuos básicos en la región 136-150, incluyendo lisina 143 y arginina 150, son importantes. (6) El uso de cristalografía de rayos X localiza el dominio de unión al receptor a un residuo básico sobre la superficie de la molécula de apo E-3 acompañado de los residuos 136 a 150 (figura 10) (Mahley, 1988; Wilson, 1991).

La apo E parece estar unida al receptor LDL mediante interacciones iónicas entre los aminoácidos básicos claves de la región 136 a 150 y los aminoácidos ácidos del receptor LDL. El receptor LDL posee siete segmentos repetidos en el N-terminal que representan el sitio ligando y contienen los aminoácidos ácidos esenciales aspartato y glutamato. Las propiedades estructurales de apo E también afectan la distribución de las diferentes isoformas entre las lipoproteínas diferentes del plasma, ya que Apo E-3 y apo E-2 se asocian preferencialmente a HDL, mientras que apo E-4 se asocia preferencialmente con VLDL. Además, el residuo 112 de apo E-4 difiere de apo E-3 y apo E-2 por tener una arginina en esta posición, mientras que apo E-3 y apo E-2 tienen una cisteína (figura 8).

#### **1.4.2.3. Sitios de Síntesis de la Apolipoproteína E.**

La apolipoproteína E es producida en varios órganos a través del cuerpo. En diferentes especies se han detectado cantidades de mRNA apo E en hígado, cerebro, bazo, pulmón, glándulas suprarrenales, ovarios, riñones y músculo (Bluc, 1983; Elshourbagy, 1985; Reyland, 1991).

La participación de varios tipos de células en la producción extensa de apo E indica la importancia de ésta proteína en el transporte de lípidos y posiblemente en funciones no relacionadas al transporte de lípidos (Mahley, 1988). El carcinoma hepático Hep G2 también sintetiza y secreta apo E (Mahley, 1988). Los macrófagos derivados de la cavidad peritoneal de ratón o de monocitos de humano también producen grandes cantidades de apo E (Mahley, 1988; Elshourbagy, 1985).

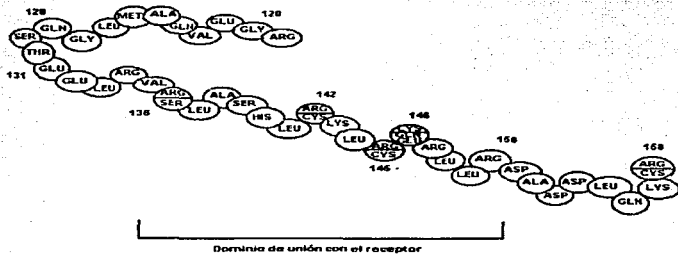


Figura 11. Secuencia de aminoácidos de Apo E en una región crítica para la unión al receptor. Se indican los sitios donde los aminoácidos neutros son sustituidos por aminoácidos básicos en la unión al receptor defectuosa de apo E para sujetos con hiperlipoproteinemia tipo III (Mahley y Rall, 1995).

La producción de apo E puede ser modulada por el estado de activación de los macrófagos. Por ejemplo, la endotoxina estimula marcadamente el descenso de la producción de apo E (Mahley, 1988).

Además de su papel en el transporte lipídico, la apo E sintetizada y secretada por macrófagos puede cambiar el estado de activación o inactivación de los macrófagos a otras células dentro del medio ambiente local. Este concepto puede emplearse para considerar un posible papel inmunorregulador de apo E. Es posible que los macrófagos sean responsables del mRNA que se ha visto en bazo y pulmones (Mahley, 1988).

La apo E no se ha encontrado en el epitelio intestinal aunque éste sea el mayor sitio de biosíntesis de las lipoproteínas. La mayor cantidad de mRNA ha sido encontrada en el hígado y es sintetizada por las células del parénquima (Elshourbagy, 1985). La segunda gran cantidad de mRNA apo E se ha encontrado en el cerebro. Los astrocitos son los principales responsables de la producción de apo E en el sistema nervioso central. Estas células llevan a cabo varias funciones en el cerebro, proveen una coraza estructural que regula las concentraciones de iones y metabolitos (Elshourbagy, 1985). A esto se debe que apo E sea la mayor apolipoproteína en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en humanos y perros. La apo E existe en LCR como pequeñas lipoproteínas discoidales y esféricas que transportan colesterol y fosfolípidos (Mahley, 1988).



En otros órganos, los macrófagos son los que se encargan de la producción de apo E. Los macrófagos en cultivo *in vitro* pueden producir grandes cantidades de esta proteína y liberarla al medio o al fluido intersticial en altas concentraciones. Otras células capaces de producir apo E son las células del músculo liso (Mahley, 1988).

Además, apo E está presente en concentraciones substanciales en el plasma y el fluido intersticial y está disponible para asociarse con varias lipoproteínas. Apo E juega el papel principal en la redistribución del colesterol de las células que contienen un exceso de colesterol hacia las células que requieren colesterol mediante procesos metabólicos, incluyendo la biosíntesis de las membranas nuevas para la proliferación celular o su reparación. Los complejos apo E-lípidos son tomados vía receptores LDL expresados en las células deficientes de colesterol. Esta función parece ocurrir durante el daño a los tejidos y su reparación. Apo E tiene un papel clave en la regeneración del sistema nervioso periférico (Mahley, 1988).

#### **I.4.3. Bases Moleculares del Polimorfismo de la Apolipoproteína E.**

La naturaleza polimórfica de apo E fué apreciada primero en los estudios de Utermann y cols. (Utermann y Vogelberg, 1979; Utermann y Pruin, 1979), quienes demostraron el polimorfismo por isolectroenfoque. Sus estudios establecen claramente la naturaleza familiar del polimorfismo de apo E. Sugieren que esta isoforma ausente fué la apo E normal y que la hiperlipoproteinemia de tipo III resulta por la herencia de dos alelos anormales de apo E.

Subsecuentemente, Zannis y Breslow, por medio de electroforésis bidimensional, hicieron dos importantes observaciones que ayudaron a clarificar el polimorfismo de apo E. Encontraron dos tipos de apo E polimórfica, uno determinado genéticamente y el otro no. Este último es el resultado de una sialilación post-traduccionnal del polipéptido apo E, dándole una o varias isoformas ácidas (Zannis y Breslow, 1981; Zannis y Just, 1981; Snowden, 1991).

Estas isoformas pueden distinguirse en un gel bidimensional por su peso molecular aparentemente alto causado por la adición de ácido siálico. Cuando la apo E fué tratada con neuraminidasa (una enzima que corta los residuos de ácido siálico), las formas de alto peso molecular desaparecieron y comigraron como la isoforma mayor de apo E genéticamente determinada (Zannis y Breslow, 1981; Zannis y Just, 1981; Snowden, 1991).

La apreciación de la complejidad de los patrones de las isoformas de apo E (formas sialiladas múltiples y no sialiladas) permite un mayor entendimiento del polimorfismo genéticamente determinado (Utermann y Vogelberg, 1979; Utermann y Pruin, 1979; Zannis y Breslow, 1982). Esto estableció que las tres isoformas mayores de apo E fueron los productos de un mismo gen y que la genética de apo E puede explicarse por la existencia de tres alelos típicos para un sólo gen. Como resultado, son posibles seis fenotipos, tres homocigotos y tres heterocigotos (Wardell, 1982).

En 1982 se estableció un sistema de nomenclatura para el polimorfismo y la genética de apo E (Zannis y Breslow, 1982). En este sistema, las tres isoformas genéticamente determinadas son E-4, E-3, y E-2, siendo E-4 diferente por su  $pI \approx 6.1$  que es más básico. Los alelos correspondientes para estos tres productos génicos se denominan  $\epsilon_4$ ,  $\epsilon_3$ , y  $\epsilon_2$ . Los seis fenotipos comunes son E-4/4, E-3/3 y E-2/2 (homocigotos) y E-4/3, E-3/2 y E-4/2 (heterocigotos) (Wardell, 1982). Las menores isoformas sialiladas (glicosiladas) son designadas con un subíndice s, por ejemplo, E-4s, E-3s, dependiendo de la isoforma que haya sido modificada. El fenotipo E-2/2 de apo E está asociado más comúnmente con la hiperlipoproteinemia tipo III. El genotipo más común entre las poblaciones estudiadas es el E-3/3 y el alelo más común es el  $\epsilon_3$ ; así mismo, E-3 es considerada como la forma normal de la proteína y, apo E4 y E2 las variantes (Mahley, 1995; Mahley, 1988; Zannis y Breslow, 1982; Zannis y McPherson, 1984). La apo E4 se une normalmente al receptor LDL pero se asocia con niveles altos de colesterol y LDL en plasma (Mahley, 1988), así como un aumento en la susceptibilidad de enfermedades cardíacas (Cumming, 1984).

Las bases moleculares del polimorfismo de apo E fueron establecidas por Mahley y colaboradores (Weisgraber, 1981; Rall, Weisgraber e Innerarity, 1982; Rall, Weisgraber y Mahley, 1982; Mahley, 1991). Ellos determinaron la estructura primaria de apo E y hallaron que las isoformas E-4, E-3 y E-2 difieren entre una y otra por una sola sustitución de aminoácidos en dos sitios de la proteína. La apo E4 difiere de la forma E3 en que la arginina de apo E4 es sustituida por cisteína, presente normalmente en el residuo 112 (Figura 12).

La forma más común de apo E2 difiere de apo E3 en el residuo 158, donde la cisteína es sustituida por arginina presente normalmente. La existencia de una sola sustitución aminoácida confirma que E-4, E-3 y E-2 se presentan para alelos separados de un sólo gen. Estas sustituciones también explican las diferencias en unidad de carga simple entre las tres isoformas, ya que involucran la sustitución del aminoácido cisteína neutro por el aminoácido arginina básico (figura 8). Las bases moleculares también han sido determinadas por el segundo tipo de polimorfismo de apo E conferido por glicosilación post-traduccional. Las isoformas glicosiladas (sialiladas) de apo E aparentes en plasma resultan del ataque de una cadena de carbohidrato a un sólo sitio con residuo de treonina 194 en apo E (Wernette-Hammond, 1989).

#### **I.4.4. Impacto del locus de apo E en las lipoproteínas y lípidos del plasma.**

El polimorfismo de apo E es uno de los factores génicos comunes responsables de las diferencias interindividuales en los niveles de lípidos y lipoproteínas. Mientras que el alelo  $\epsilon_3$  no muestra desviaciones en la población, Sing y Davignon encontraron que los alelos  $\epsilon_4$  y  $\epsilon_2$  tienen efectos significantes sobre varios parámetros de lípidos y lipoproteínas (Sing, 1985). El alelo  $\epsilon_2$  ha demostrado estar asociado a niveles bajos de colesterol en plasma, colesterol en LDL, y apo B, al ser comparado con los niveles en individuos con el alelo  $\epsilon_3$ .

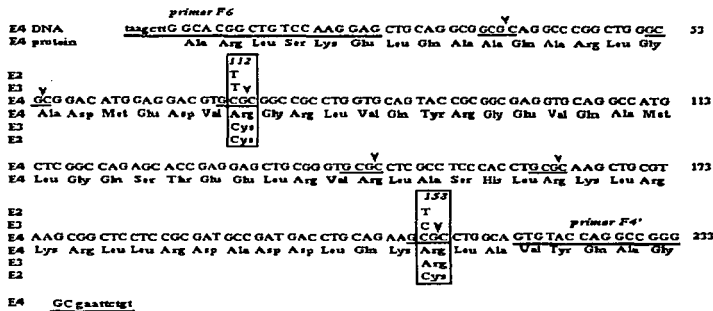


Figura 12. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las tres isoformas de apo E: E2, E3 y E4, que ilustra los sitios de corte (GCGC) de la endonucleasa de restricción Hha I, además de los oligonucleótidos F4 y F6 que flanquean al gen apo E durante la reacción de amplificación por PCR (Hixson y Vernier, 1990).

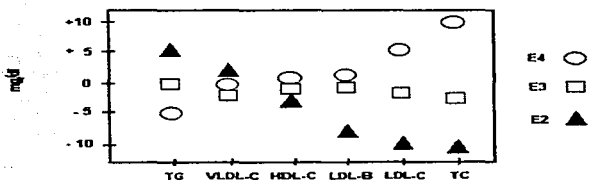


Figura 13. Los efectos de los alelos de apo E sobre varios parámetros lipoprotéicos. TG = Triglicéridos totales en plasma; VLDL-C = Colesterol en VLDL; HDL-C = Colesterol en HDL; LDL-B = apo B en LDL; LDL-C = Colesterol en LDL; TC = Colesterol total en plasma (Mahley y Rail, 1995).

Inversamente, el alelo e4 está asociado con niveles altos de colesterol total y colesterol en LDL (figura 13 ). Utermann y cols. reportaron que apo E2 se encuentra significativamente más frecuente en sujetos hipertriglicéridémicos, mientras que apo E4 se observa con mayor frecuencia en sujetos hipercolesterolémicos (Utermann y Vogelberg, 1979; Utermann y Pruin, 1979).

En un trabajo se evaluaron los datos de siete estudios diferentes que incluyen poblaciones Caucásicas y Asiáticas y demostraron un patrón marcadamente consistente: los individuos con fenotipo E-2/2 tienen bajo nivel de colesterol en plasma, mientras que los que tienen fenotipo E-4/4 tienen altos niveles de colesterol en plasma (Mahley, 1995).

#### **I.4.5. Papel de la apo E en el Metabolismo Normal de Remanentes.**

Apo E es importante en la mediación del catabolismo de lipoproteínas remanentes. Esto ha sido establecido por numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, y confirmados por el papel de apo E en hiperlipoproteinemia tipo III. En pacientes deficientes de apo E o con apo E defectuosa, es característico encontrar hipertriglicéridemia e hipercolesterolemia por acúmulo marcado de quilomicrones remanentes y VLDL remanentes. Tales pacientes tienen receptores para lipoproteínas estructuralmente normales y lipasas normales; el defecto crítico es una apo E estructuralmente anormal o ausente (Mahley, 1995; Rall, Weisgraber e Innerarity, 1982; Mahley, 1991). Por otra parte, el impacto de apo E en el ratón por recombinación homóloga resulta en una hipercolesterolemia caracterizada por acúmulo de remanentes (Mahley, 1995).

Fazio y colaboradores demostraron que el ratón transgénico expresa una forma mutante de apo E [Arg 142 → Cys] defectuosa en su unión al receptor que también conduce a una marcada hiperlipidemia y acúmulo de  $\beta$ -VLDL's en plasma (Fazio, 1993).

Varios pasos parecen estar involucrados en la captación de los quilomicrones y VLDL remanentes por el hepatocito. Los quilomicrones y VLDL remanentes pasan a través de la capa de células endoteliales del sinusoides hepático en el espacio de Disse. El espacio de Disse es un área linfática que contiene los proteoglicanos y las proyecciones microvellosas de los hepatocitos (Hamilton, 1990).

Las moléculas que entran al hígado y que son secretadas por los hepatocitos atraviesan este espacio (Figura 14). Los pasos involucrados en el metabolismo de remanentes son secuestro, procesamiento, e internalización.

**Secuestro.** Un paso inicial importante en la liberación de remanentes del plasma puede ser la secuestro de las partículas en el espacio de Disse. Esto ha sido postulado como la construcción de partículas lipoproteínicas con los proteoglicanos en el espacio de Disse (Hamilton, 1990). Se sabe que apo E se une avidamente a la heparina (Mahley, 1984; Mahley, 1979) y específicamente al heparán sulfato de origen hepático.

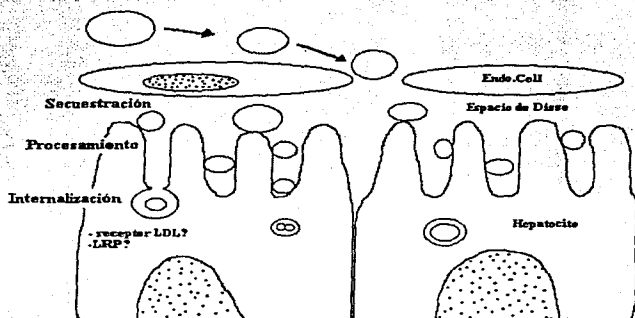


Figura 14. Pasos involucrados en la captación de remanentes del plasma (Mahley, 1995).

Por inmunquímica con microscopía electrónica, se ha visto que el espacio de Disse posee abundantes proteoglicanos de sulfato de haparán (HSPG), formando una capa continua sobre las microvellosidades de los hepatocitos. Estos HSPG pueden ser los responsables de la liberación inicial de los remanentes por el plasma. Además, se ha demostrado que apo E se acumula en el espacio de Disse (Hamilton, 1990), donde puede adherirse a los proteoglicanos o a receptores de lipoproteínas, tales como LRP (Beisiegel, 1989).

**Procesado.** Un segundo paso puede involucrar el procesamiento de los quilomicrones remanentes por lipasas en las células del endotelio sinusoidal o dentro del espacio de Disse. Se sabe que la lipasa hepática está unida a la heparina producida por el hígado (Doolittle, 1987) e involucrada en el procesamiento final de los remanentes. Además, el papel directo de la lipoproteína lipasa (LPL) es mediar la toma celular de remanentes y otras lipoproteínas (Beisiegel, 1991). La LPL, que normalmente reside en la superficie del endotelio extrahepático ataca a los proteoglicanos de la superficie celular, atacando así al quilomicrón que es transportado dentro del hígado, donde se aumenta la unión de los remanentes al LRP (Beisiegel, 1991).

**Internalización.** La toma de los remanentes por los hepatocitos está mediada por receptores. Se ha visto que el quilomión remanente se une a los receptores LDL in vitro, por lo que el receptor LDL tiene un papel importante en el catabolismo de remanentes (Figura 14).

Herz y cols. (Herz, 1988), clonaron un cDNA que codifica para una proteína de 600 kD, la proteína relacionada a las lipoproteínas (LRP), que presenta marcada homología estructural con el receptor LDL (Beisiegel, 1989). La LRP contiene 31 repetidos ricos en cisteína homologos al dominio de unión al ligando del receptor LDL y funcionan como receptor. Por comparación, el receptor LDL posee siete de esos dominios de unión al ligando. A diferencia del receptor LDL, para el que apo B-100 y apo E actúan como ligandos, apo E es la única apolipoproteína ligando para el receptor LRP (Beisiegel, 1989). Kowal y cols. demostraron que los  $\beta$ -VLDL ricos en apo E interactúan con los LRP (Kowal, 1989).

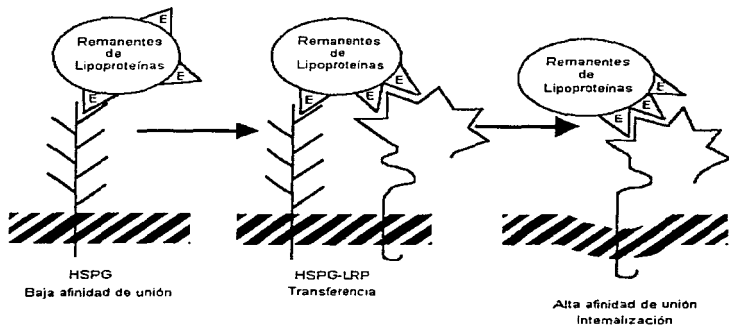


Figura 15. Los proteoglicanos de sulfato de heparán son los responsables de la unión inicial de los remanentes ricos en apo E (Mahley, 1995).

Parece que LRP es responsable de la internalización de los remanentes ricos en apo E, pero que la unión inicial requiere la participación de HSPG sobre la superficie celular (Mahley, 1995). Varios estudios establecen la importancia de HSPG en la unión de los remanentes ricos en apo E y sugieren que el LRP sólo, en ausencia de HSPG, es insuficiente para mediar la unión a la superficie celular. Como se ilustra en la figura 15, el HSPG y el LRP forman un complejo involucrado en la mediación del metabolismo de los remanentes: HSPG es responsable de la unión inicial y LRP es responsable de la internalización (Mahley, 1995; Beisiegel, 1989).

#### I.4.6. Depósitos de $\beta$ -VLDL en Macrófagos.

Los  $\beta$ -VLDL son propensos a ser captados por los macrófagos y causan el acúmulo masivo de colesterol (como ésteres de colesterol) en estas células (Mahley, 1984; Mahley, 1983). La primer demostración de esto se observó en macrófagos peritoneales de ratón, pero también se ha encontrado en macrófagos-monocitos de humano. Las células espumosas en xantomas y en algunas lesiones ateroscleróticas derivan, en gran parte, de los macrófagos (Mahley, 1995; Mahley, 1988).

La captación de  $\beta$ -VLDL por los macrófagos es un evento mediado por receptores, y algunos estudios sugieren que hay receptores específicos para  $\beta$ -VLDL en estas células. El receptor LDL es responsable de la captación de remanentes en los monocitos-macrófagos en humanos. El ligando para el macrófago que internaliza los  $\beta$ -VLDL es apo E, como se demostró en animales alimentados con dietas ricas en colesterol (Mahley, 1983).

La apo E tiene un papel en la movilización de colesterol para las células periféricas, incluyendo los macrófagos. Se ha visto que el acúmulo de colesterol en los macrófagos estimula la producción y secreción de apo E. La apo E secretada por estas células forma complejos lípidos-apo E o es incorporada a partículas HDL (Mahley, 1988). Estos complejos o partículas pueden adquirir el colesterol de las células cargadas de colesterol y redistribuirlo a las células que lo requieren (Mahley, 1983).

Las HDL ricas en apo E actúan como removedores de colesterol en células periféricas y lo transportan a otras células que lo requieran o al hígado, donde el colesterol puede ser excretado por el cuerpo en la bilis como sales biliares o colesterol libre (Mahley, 1983). Estos procesos de redistribución de colesterol son referidos como una forma de transporte de colesterol inverso.

#### I.4.7. Apolipoproteína E y Sistema Nervioso Central.

El cerebro contiene un alto nivel de mRNA Apo E pero es menor a los niveles hepáticos (Elshourbagy, 1985). La concentración de apo E en el LCR es mucho mayor que en la barrera hematoencefálica, lo que sugiere que la apo E es sintetizada y secretada principalmente por astrocitos locales y oligodendrocitos (Mahley, 1988). La producción y el acúmulo de apo E aumentan considerablemente en padecimientos del Sistema Nervioso Central (SNC) (Tsai, 1994).

La apo E juega un papel importante en la degeneración y regeneración del tejido nervioso (Schellenberg, 1995).

Un modelo interesante involucra el almacenaje coordinado y la redistribución de colesterol entre las células de nervios periféricos dañados y regenerados. Se ha observado que después de una ruptura o un corte al nervio ciático de rata, la apo E es producida y acumulada 100 a 200 veces más que en nervios no dañados. La apo E extracelular puede alcanzar niveles que representan el 5% del total de la proteína soluble en el segmento nervioso en regeneración. La producción pico de apo E es de 7 a 10 días después del daño neural y retorna lentamente a su nivel normal luego de 8 semanas, cuando la regeneración del nervio ciático de rata se completa (Mahley, 1988).

La célula responsable de la producción de apo E en esta situación es el macrófago. Inmediatamente después del daño, los macrófagos residentes en el nervio ciático inician la secreción de apo E. Además, como parte de la reacción inflamatoria, los monocitos se agregan rápidamente a la región afectada, convirtiéndose en macrófagos, y produciendo también apo E. La degeneración del axón y la destrucción de la mielina proceden rápidamente. Mucho del colesterol, y posiblemente otros lípidos clave, son retenidos dentro del área de degeneración y acumulados dentro de las células de Schwann y los macrófagos. En 1 o 2 días se inicia la regeneración, para lo cual se expresa gran cantidad de receptores LDL. Es muy posible que la apo E unida a los lípidos en el fluido intersticial libere colesterol a las neuritas vía receptores LDL (Mahley, 1988).

Dentro de 1 a 2 semanas, la remielinización del axón por las células de Schwann se lleva a cabo. Los lípidos almacenados en las células de Schwann son descargados, y estas mismas células expresan receptores LDL, presumiblemente para mediar la captación de colesterol para la formación de mielina. Es probable que el colesterol del macrófago sea liberado hacia los complejos apo E-lípidos o a las HDL en el fluido intersticial y que la apo E medie la captura de colesterol vía receptores LDL sobre las células de Schwann (Mahley, 1988).



#### 1.4.8. Enfermedad de Alzheimer, proteína $\beta$ -amiloide y Apo E.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento degenerativo del SNC caracterizado por pérdida de memoria y deterioro de las funciones cognitivas (Alonso, 1994; Holtzman, 1991). Es una forma de demencia progresiva que afecta principalmente a personas mayores de 60 años de edad (Saunders, 1993).

Hay dos tipos de EA: La forma familiar y la esporádica. En el 10 % los casos de enfermedad de Alzheimer familiar (EAF), la alteración es segregada como familias de generación en generación, siguiendo un patrón de herencia autosómico dominante (Schellenberg, 1995; Kamboh, 1995).

Debido a la variación de edades al inicio de la enfermedad, EAF se ha categorizado en inicio temprano ( $</=$  a 65 años) e inicio tardío ( $=/ >$  a 65 años). En la EA esporádica (EAE) no existen antecedentes familiares de la enfermedad y se ha categorizado en forma de inicio temprano ( $</=$  a 65 años) e inicio tardío ( $=/ >$  a 65 años) (Kamboh, 1995).

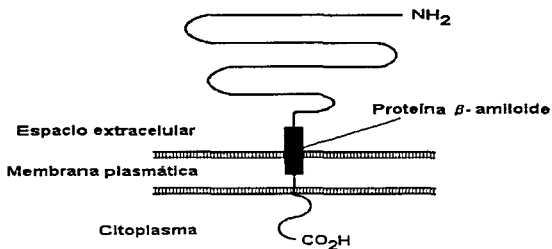
En cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer se han encontrado concentraciones altas de apo E, por lo que se piensa que esta proteína puede ser un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad (Strittmatter, 1993; Tsai, 1994).

En pacientes estudiados postmortem se han encontrado alteraciones como muerte neuronal selectiva, presencia de depósitos proteináceos anormales (marañas neurofibrilares) (Saunders, 1993) y aglomeraciones de terminaciones nerviosas en la corteza cerebral (placas neuríticas) (Schellenberg, 1995; Holtzman, 1991).

Las placas neuríticas están formadas por neuritas, células gliales y una sustancia amiloide cuyo componente principal es un péptido de 40-42 aminoácidos denominado  $\beta$ -amiloide (Schellenberg, 1995; Alonso, 1994; Holtzman, 1991; Saunders, 1993; Kamboh, 1995; Dewji, 1996). Se ha postulado que el acúmulo de la proteína  $\beta$ -amiloide dispara la degeneración de las neuronas, causando la pérdida de la memoria y otros síntomas de la enfermedad de Alzheimer (Marx, 1991; Wirak, 1991).

La proteína  $\beta$ -amiloide (4 kD) se sintetiza como parte de una gran proteína, llamada Proteína Precursora del Amiloide (PPA) (Marx, 1991) que es una glicoproteína integral de membrana codificada en el cromosoma 21q21.1. (Walden, 1994; Schellenberg, 1995; Wirak, 1991; Goate, 1991) (Figura 16). El gen APP sufre una *escisión alternativa* (eliminación de intrones) que genera varias formas proteicas que son designadas por un número total de aminoácido; en cada una. La forma de APP más común es de 770 aa; las otras formas incluyen 751, 714, 695, 677, 563 o 365 aa (Kamino, 1992). Con excepción de las 2 últimas, todas las formas de APP contienen la secuencia de la proteína  $\beta$ -amiloide (Schellenberg, 1995; Holtzman, 1991; Kamboh, 1995).

Se han desarrollado modelos animales que permitan entender el papel de la proteína  $\beta$ -amiloide en las "placas" que se forman en cerebros de pacientes con EA consistentes de terminales nerviosas degeneradas circundando a un acúmulo de fibrillas de  $\beta$ -amiloide (Wirak, 1991).



**Figura 16.** Proteína Precursora del Amiloide. El  $\beta$ -amiloide está parcialmente integrado a la membrana plasmática de las células nerviosas.

Wirak y sus colegas produjeron varias líneas de ratón transgénico, cada uno portando una construcción genética diferente de PPA (PPA con un inhibidor insertado; C-terminal PPA de 104 aminoácidos; y  $\beta$ -amiloide) en los cuales encontraron depósitos de amiloide sólo en cerebros de animales que recibieron la construcción simple, que codifica sólo para el  $\beta$ -amiloide de PPA (Schellenberg, 1995; Marx, 1991; Wirak, 1991). Las fibras encontradas tienen la misma apariencia que las placas típicas de la EA. Los depósitos se encontraron en la corteza cerebral, y principalmente en el hipocampo, región cerebral importante para la memoria y el aprendizaje, y una de las principales áreas afectadas en la enfermedad de Alzheimer (Schellenberg, 1995; Marx, 1991; Wirak, 1991; Van Broeckhoven, 1987).

#### L4.8.1. Asociación patogénica.

Existen evidencias de que apo E tiene un papel causal en la patogénesis de la EA. La apo E se localizó inmunquimicamente en lesiones patológicas definidas de EA, incluyendo las placas seniles extracelulares y las marañas neurofibrilares intracelulares (Strittmatter, 1993; Kamboh, 1995). El péptido  $\beta$ -amiloide es el mayor componente de los depósitos amiloides; una proteína conocida como *tau* está asociada con la formación de las marañas neurofibrilares (Sherrington, 1995). La apo E se une con la proteína amiloide y con tau, y así participa directamente en la neuropatología de EA (Schellenberg, 1995). El acúmulo del  $\beta$ -amiloide es considerado como neurotóxico y puede conducir al daño neural, esto produce un aumento en la concentración de apo E en el sitio afectado y promueve el hallazgo de apo E con el  $\beta$ -amiloide en las placas seniles. La unión de apo E con el péptido  $\beta$ -amiloide se ha confirmado en estudios *in vitro* (Strittmatter, 1993). Aunque la forma común (apo E3) y la forma variante (apo E4) se unen al  $\beta$ -amiloide, la unión de apo E4 con éste péptido es mucho más rápida y fuerte que la unión de apo E3 con el  $\beta$ -amiloide (Kamboh, 1995), pero apo E4 no es tan efectiva como apo E3 para suprimir la neurotoxicidad del  $\beta$ -amiloide; de ésta manera es como se asocia con el aumento de las placas amiloides (Kamboh, 1995).

Las marañas neurofibrilares se componen de pares de filamentos helicoidales (PFHs) (Kamino, 1992), que están compuestos por tau, una proteína altamente fosforilada (Kamboh, 1995). Tau es una proteína asociada a los microtúbulos (PAM) cuya función normal es promover y estabilizar el ensamblaje de los microtúbulos, en otras palabras, organizar la estructura intracelular en el citoplasma así como al transporte de moléculas entre los componentes celulares y las terminales nerviosas. Sin embargo, la fosforilación de tau reduce su efecto estabilizante. Tau en estado normal y en EA tiene un sólo sitio de fosforilación en su porción C-terminal, mientras que PFHs asociados a tau son fosforilados anormalmente en más de siete sitios a lo largo de la molécula. En consecuencia la tau hiperfosforilada no une ni estabiliza los microtúbulos, conduciendo a la formación de marañas y causando que los microtúbulos desestabilizados finalmente se colapsen en los cerebros de los pacientes con EA (Kamboh, 1995). La participación de apo E en la patología de las marañas neurofibrilares se confirmó con las observaciones de que apo E fué inmunolocalizada en las neuronas y en las marañas neurofibrilares unida a tau. Sin embargo, la unión de apo E a tau es isoformoespecífica: tau se une a apo E3 y E2 pero no a apo E4. Esto significa que la EA puede deberse más a la ausencia de apo E3 o apo E2 que a la presencia de apo E4 (Figura 17) (Kamboh, 1995).

De acuerdo con ésta hipótesis representada en la fig.17, la unión de apo E3, y posiblemente apo E2, con Tau tiene efecto protector para la hiperfosforilación, así la formación de marañas neurofibrilares se lleva a cabo lentamente. De otra manera, la incapacidad de apo E4 para unirse con Tau conduce a una fosforilación anormal de Tau, y eventualmente se forman las marañas (Kamboh, 1995).

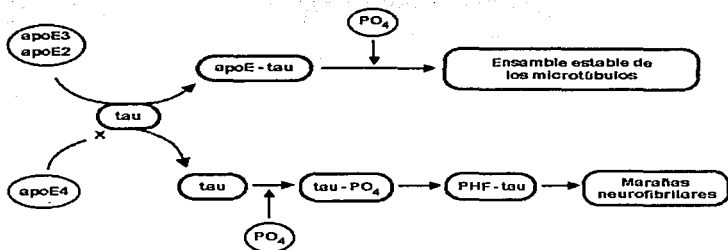


Figura 17. Unión isoformo-específica de apo E con tau. Aunque las isoformas apoE2 y apoE3 se unen a tau y confieren efecto protector contra la hiperfosforilación, la isoforma apoE4 no se une a tau y esto provoca que tau sea hiperfosforilada, conduciendo a la formación de las marañas neurofibrilares.

Se ha observado que en diferentes poblaciones el genotipo 4/4 es más frecuente en los pacientes con EA, lo que hace suponer que la apolipoproteína E de tipo E4 (APOE ε4) es un factor de riesgo para la EA familiar de inicio tardío (Saunders, 1993), ya que existe gran afinidad entre el péptido β-amiloide y la proteína apo E (Corder, 1993). Esto no implica que todos los individuos con EA son homocigotos para el alelo E4, así como no todos los individuos homocigotos para este alelo desarrollan EA (Kamboh, 1995). Simplemente, la presencia de un alelo E4, conjuntamente relacionado con otros factores genéticos o ambientales, aumenta significativamente el riesgo de desarrollar EA (Kamboh, 1995). Los individuos con dos copias del alelo E4 tienen riesgo mucho mayor de desarrollar la enfermedad; mientras que otros estudios sugieren que la presencia de un alelo E2 le confiere al individuo un efecto protector para la EA (Kamboh, 1995; Corder, 1994).

## II. OBJETIVOS

## **II.1. *Objetivo General.***

Determinar las frecuencias alélicas del gen de la apolipoproteína E en una muestra de la población mexicana normal, con el fin de estimar la frecuencia con la que aparecen normalmente los alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  en personas de origen mexicano y puedan ser comparadas en estudios posteriores con las frecuencias alélicas determinadas en pacientes con Enfermedad de Alzheimer.

## **II.2. *Objetivos Particulares.***

1.- Determinar la frecuencia de los alelos del gen de la apolipoproteína E, por medio de la isotipificación con la enzima de restricción Hha I, para establecer los valores normales en una muestra de la población mexicana.

2.- Determinar la estructura génica de la población mexicana respecto al gen APO E, a través de los diferentes patrones de bandas generados del DNA restringido, para comparar los resultados con los reportados para otras poblaciones.

3.- Investigar si la frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  del gen APO E es alta o baja en nuestra población, comparando la frecuencia de este alelo con las reportadas para otras poblaciones, con el fin de que, en estudios posteriores, se puedan evaluar estadísticamente las frecuencias calculadas en pacientes con Enfermedad de Alzheimer y nuestros resultados, y se determine si el alelo  $\epsilon 4$  es un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad de Alzheimer en población mexicana.

### **III. MATERIAL Y METODOS**

### **III.1. Material.**

#### **III.1.1. Químico.**

- Acido cítrico-dextrosa (ACD).
- MgCl<sub>2</sub>
- Acido etilendiamintetracético (EDTA).
- Fenol saturado.
- Alcohol isoamílico.
- Isopropanol.
- Bromuro de etidio.
- N-N'-metilen-bis-acrilamida.
- TEMED.
- Agua deionizada.
- TRISMA base.
- NaCl
- Duedilsulfato de sodio (SDS).
- Clorofbrmo.
- Etanol absoluto.
- Agarosa (grado electroforético).
- Acrilamida (grado electroforético).
- Persulfato de amonio.
- Acido bórico.

#### **III.1.2. Biológico.**

Este trabajo se realizó estudiando una muestra de 186 individuos normales de la población mexicana (93 mujeres y 93 hombres); algunos fueron captados en asilos y grupos de jubilados que asisten a centros recreativos de la Ciudad de México; otros son familiares de los pacientes que acuden al Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", con un rango de edad de 52 a 94 años; y algunos más que acuden al mismo Instituto en calidad de donadores de sangre, con un rango de edad de 20 a 40 años. A todas las personas mayores de 60 años se les realizó una evaluación del estado mental mediante la Prueba corta del estado mental de Folstein (Bleecker, 1988), que consiste en un examen psicológico con el que se explora el estado mental y los aspectos cognoscitivos de cada individuo. En todos los individuos analizados en este estudio la prueba de Folstein resultó normal. Todos los individuos fueron hijos y nietos de mexicanos o tenían un abuelo español.

#### **III.1.3. Equipo.**

- Bomba de vacío.
- Centrifuga 5415C Eppendorf.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Baño maría con agitación Cole Parmer.
- pH metro BECKMAN.
- Microcentrifugas SORVALL MC 12V.
- Espectrofotómetro DU-40 BECKMAN.
- Centrifuga GS-6R BECKMAN.
- Balanza analítica SHIMADZU.
- Termociclador 9600 PERKIN ELMER.



- Cámara de electroforesis vertical.
- Fuente de poder 500 BRL.
- Equipo fotográfico POLAROID DS 34
- Ultracentrifuga SORVALL RC 28S.
- Transiluminador de luz UV Cole Parmer.
- Negatoscopio.

### METODOLOGIA



Figura 18. Diagrama de flujo que representa a grandes rasgos la metodología realizada.

## **III.2. Métodos.**

### **III.2.1. Obtención de la muestra.**

A cada individuo se le tomó una muestra de 20 ml de sangre periférica con anticoagulante ACD, a partir de la cual se extrajo DNA genómico de leucocitos separados por centrifugación a 5000 rpm/4°C/10 min lisando los eritrocitos con "buffer de lisis de células rojas" (solución salina) hasta obtener el botón de leucocitos.

### **III.2.2. Extracción de DNA.**

Se extrajo el DNA genómico empleando el micrométodo de extracción de DNA con sales y fenol-cloroformo. Con esta técnica se altera la permeabilidad de la membrana celular; la fuerza mecánica empleada para mezclar el contenido de cada tubo (leucocitos/reactivos) ayuda a romper las membranas celulares, dejando libre al DNA que es purificado con extracciones de fenol saturado (elimina proteínas y restos celulares), fenol-cloroformo (elimina residuos de fenol saturado) y cloroformo-alcohol isoamílico (elimina residuos de fenol-cloroformo). El DNA es precipitado con isopropanol y disuelto en agua estéril.

### **III.2.3. Cuantificación de DNA.**

El DNA genómico fué cuantificado por espectrofotometría y en gel de agarosa.

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta (absorbancia: 260 nm) en un espectro diferente al de las proteínas (absorbancia: 280 nm), así que se aprovecha ésta propiedad para cuantificar tanto DNA como proteínas en la muestra y poder hacer una estimación de la calidad del DNA. La concentración de DNA se calcula en ng/ $\mu$ l.

El gel de agarosa se empleó para observar la integridad del DNA, mismo que se resuelve en forma paralela a un marcador de pesos moleculares ( $\lambda$  Hind III). Este marcador posee un patrón de bandas con peso específico, el cual sirve para tener una perspectiva de la cantidad de DNA existente en la muestra.

### III.2.4. Amplificación de DNA.

Una vez conocida la concentración en ng/ $\mu$ l de DNA, se realizó la amplificación del gen APO E mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La reacción en cadena de la polimerasa, un método de amplificación de DNA *in vitro*, se lleva a cabo mediante ciclos repetitivos de 3 eventos: desnaturalización, extensión y polimerización de DNA a diferentes temperaturas (Darnel, 1993). Con este método se pueden amplificar fragmentos de DNA y producir cantidades suficientes para el análisis de muestras muy pequeñas, incluyendo secciones de tejido en parafina, frotis citológicos, cabello, orina y células simples. Los reactivos requeridos son 1) el DNA blanco (usualmente DNA genómico leucocitario); 2) dos secuencias cortas de DNA de cadena sencilla llamadas oligonucleótidos (*primers*) con secuencias complementarias a las áreas que flanquean la región a ser amplificada; 3) los 4 desoxirribonucleótido trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); y 4) una DNA polimerasa (Walden, 1994; Maniatis, 1989; McPherson, 1993).

Los ciclos de PCR consisten de 1) desnaturalización del DNA blanco de doble cadena a dos cadenas sencillas a 94 °C; 2) alineación de los oligonucleótidos a cada una de las cadenas sencillas de DNA blanco a una temperatura específica, usualmente cerca de los 60 °C; y 3) extensión de los oligonucleótidos en ambas direcciones (5' y 3') a través del DNA blanco, típicamente a 72 °C (Figura 19) (Maniatis, 1989). Los ciclos se repiten 30 veces o un poco más. Los fragmentos recién sintetizados, a su vez, sirven como DNA blanco para una "reacción en cadena" que resulta en la amplificación exponencial de la secuencia en estudio, produciendo millones de copias. Los fragmentos de DNA con tamaños de 40 o más de 2000 pb pueden ser amplificados en tan sólo unas horas (Walden, 1994; Wenham, 1991; McPherson, 1993).

Las condiciones de reacción para la amplificación del gen APO E fueron modificadas en base a las planteadas por Hixson y Vernier; quienes emplearon los oligonucleótidos específicos para el gen. F4 (5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTAC AC -3') y F6 (5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA -3') (Hixson y Vernier, 1990). Cada mezcla de reacción de PCR contiene DNA genómico (500 ng/ $\mu$ l); oligos F4 y F6 (200 ng/ $\mu$ l); buffer adicionado con MgCl<sub>2</sub> (15mM); Dimetil sulfóxido (10 %); DNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (100 ng/ $\mu$ l); Taq DNA polimerasa (4.0 U/ $\mu$ l); a un volumen de reacción de 30  $\mu$ l. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador bajo los siguientes eventos: 1) desnaturalización a 94 °C/5 min; 2) 40 ciclos de 3 pasos cada uno: desnaturalización a 94 °C/0.5 min; alineación de oligos a 65 °C/0.5 min, y extensión a 70 °C/1.5 min; 3) Extensión a 70 °C/10 min, y 4) Fin de la reacción a 4 °C.

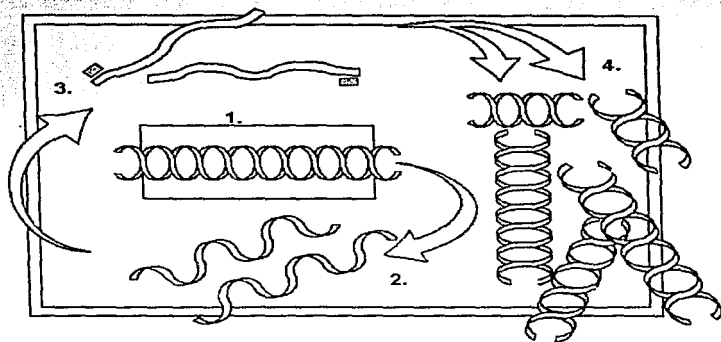


Figura 19. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). 1) La mezcla de reacción contiene al DNA blanco; 2) Desnaturalización del DNA genómico; 3) Alineación de oligonucleótidos F4 y F6 a las cadenas sencillas de DNA blanco; 4) Extensión en ambas direcciones por la Taq polimerasa (McPherson, 1991).

### III.2.5. Digestión de DNA.

Los productos de amplificación fueron digeridos con 4.0 U de la enzima de restricción Hha I (10 U/ $\mu$ l) a 37 °C durante 4 horas (Hixson y Vernier, 1990), previa cinética enzimática donde se analizó la cantidad de enzima necesaria para la digestión completa del DNA (pruebas de 1, 2, 5 y 10 U de Hha I). La enzima reconoce la secuencia GCGC.

### III.2.6. Electroforesis.

Las secuencias APO E amplificadas y digeridas fueron resueltas en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8 % (rango de separación: 60 a 400 pb), durante 2.5 horas a 45 mA (Hixson y Vernier, 1990). El gel fué teñido con bromuro de etidio, que es un colorante que se intercala entre los pares de bases del DNA, el cual fluoresce con luz

UV y revela la localización del DNA en el gel. El tamaño de las bandas correspondientes a los patrones generados por la enzima Hha I fue estimado por comparación con las bandas de los marcadores de peso molecular: pBR 322 DNA + Hae III (M1) y pUC BM 21 DNA + Hpa II + pUC BM 21 DNA + Dra I + Hind III (M2). De cada gel de electroforesis se tomó una fotografía para el posterior análisis de los haplotipos correspondientes a cada individuo.

### III.2.7. Análisis de genotipos.

La figura 20 muestra los genotipos resultantes de todas las combinaciones posibles de las tres isoformas de apo E y el patrón de bandas correspondientes a cada genotipo; éstos patrones se diferencian entre sí por la presencia o ausencia de ciertas bandas cuyo peso molecular se encuentra en la columna de la derecha.

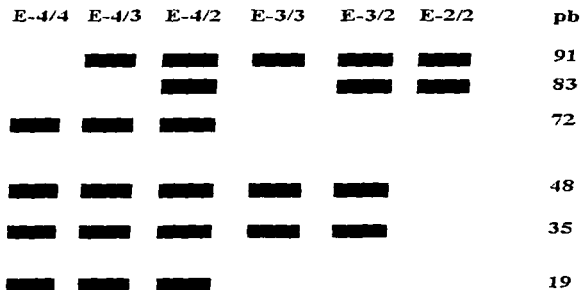


Figura 20. Haplotipos de apo E. Diferentes patrones de bandas correspondientes a cada uno de los genotipos de apo E, generados con la enzima de restricción Hha I.

Algunos estudios realizados en diferentes poblaciones reportan la presencia de los seis genotipos en la población estudiada; también existen trabajos en los que se reporta la ausencia de uno o dos genotipos en determinadas poblaciones. En nuestra población se esperaba obtener los seis genotipos, lo cual no fué posible ya que no existe la presencia de dos genotipos representados en la figura anterior. Esto se aprecia mejor en la figura 21 correspondiente a la sección de resultados.

#### **IV. RESULTADOS**

#### **IV.1. Obtención de la muestra.**

El anticoagulante ACD conserva en buen estado las muestras para su tratamiento posterior (aproximadamente una semana). De algunas personas no fue posible obtener los 20 ml de sangre, por lo que sólo se les extrajo un volumen de 10 ml o menos, sin embargo no hubo problema alguno en el tratamiento de la muestra.

#### **IV.2. Extracción de DNA.**

Implica un proceso muy laborioso el extraer DNA libre de impurezas, y el tiempo invertido en la realización de la técnica es bastante largo (en lo personal: 6 horas para 15 muestras). Por lo anterior se recomienda un adiestramiento previo en extracción de DNA para adquirir las habilidades necesarias, y que no se pierdan las muestras de interés cuando sean procesadas por este método; una mala extracción produce DNA de mala calidad, ya sea porque esté degradado o porque contenga muchas proteínas que lo contaminan.

#### **IV.3. Cuantificación de DNA.**

##### **IV.3.1. Espectrofotometría.**

La mayoría de los DNAs cuantificados presentaron concentraciones que van de 500 a 1200 ng/ $\mu$ l en el espectro de luz UV a 260 nm de absorbancia, y sólo algunos presentaron concentraciones bajas (200 a 400 ng/ $\mu$ l). Algunas muestras dieron lecturas altas de contenido de proteínas, sin embargo este dato carece de importancia debido a que dichas muestras presentaron lecturas elevadas de contenido de DNA.

##### **IV.3.2. En gel de agarosa.**

Al realizar la electroforesis en gel de agarosa, aproximadamente la mitad del número de muestras presentó una banda de DNA íntegro (~2000 pb) con algunos residuos de sales; el resto de las muestras presentaron (algunas) DNA íntegro y DNA degradado, y otras revelaron la existencia de DNA degradado en mayor cantidad que el DNA íntegro; sin embargo, todas las muestras reaccionaron de manera efectiva al realizar el PCR.



#### **IV.4. Amplificación de DNA.**

La amplificación de DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica que sólo implica un tiempo de 30 a 60 minutos para realizar todo el procedimiento manual, dependiendo del número de muestras que se deseen amplificar. Una vez dispuestas todas las mezclas de reacción para el PCR, el termociclador se encarga del resto. De modo que el único problema que implica esta técnica existe cuando no se trabaja adecuadamente para evitar que se contaminen nuestras reacciones; es por eso que se recomienda colocar un tubo blanco que sólo contiene los oligonucleótidos como únicas secuencias de DNA. En la electroforesis se observa el producto del PCR, si el blanco presenta alguna otra banda además de las correspondientes a los oligonucleótidos, significa que hubo contaminación; si el blanco sólo presenta las bandas respectivas a los oligos, significa que el trabajo está bien hecho pues no hay contaminación y, por lo tanto, nuestras muestras exhibirán únicamente las bandas de DNA amplificado.

#### **IV.5. Electroforesis en gel de acrilamida.**

Esta técnica es ampliamente utilizada para separar los fragmentos de DNA generados por la enzima de restricción. El único inconveniente de un gel de poli(acrilamida) radica en el cálculo inadecuado de las cantidades de los reactivos involucrados, mismo que se ve reflejado en la polimerización de la acrilamida y la resolución de las muestras a lo largo del gel. Si no hay polimerización, es decir, si el gel no se ha formado o si no está completamente gelificado, es muy probable que la concentración de acrilamida sea inapropiada o la cantidad y calidad de algún otro reactivo están mal indicadas.

Algunas veces, al observar el gel en luz ultravioleta, se cuenta un determinado número de bandas de DNA, y al tomar la fotografía del gel observamos que las bandas más ténues no fueron captadas en el papel, ya sea por falta de tiempo de exposición de la película o que el tiempo de tinción con bromuro de etidio fue muy poco, o bien, que el gel contiene demasiado bromuro de etidio y eso impide que resalten a la vista las bandas más pequeñas. De modo que algunos geles tuvieron que ser interpretados directamente bajo luz UV y los demás se conservan en fotografías.

A continuación se presentan los genotipos representativos de nuestra población a través de la fotografía de un gel de electroforesis (figura 21) y el análisis correspondiente de la fotografía, lo que se complementa en la siguiente sección referente a frecuencias genotípicas y alélicas.

**GENOTIPOS DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEINA E  
EN POBLACION MEXICANA**

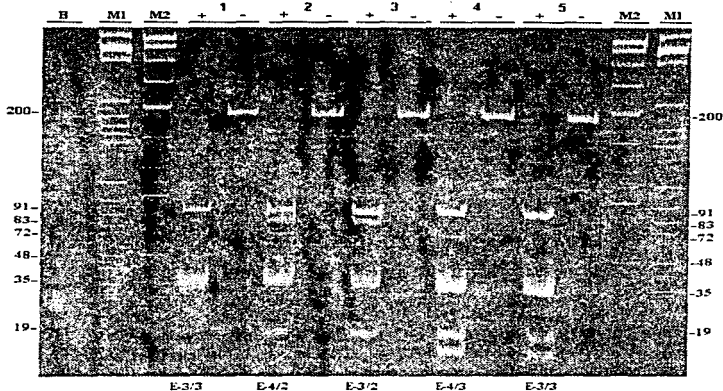


Figura 21. Gel de poliacrilamida con los genotipos de apo E característicos de la población mexicana, en el que se presentan 5 muestras de DNA (1,2,3,4,5), los carriles marcados con signo (+), corresponden al DNA digerido con Hha I, y los carriles marcados con signo (-), corresponden al DNA sin digerir; M1 y M2 son los marcadores de peso molecular (descritos en la metodología), y en el extremo izquierdo se encuentra el blanco (B) que muestra solamente los oligonucleótidos F4 y F6.

En la figura 21 se muestran los genotipos del gen APO E representativos de la población mexicana (E-3/3, E-4/3, E-3/2 y E-4/2). Esta fotografía corresponde a un gel de electroforesis en poliacrilamida no desnaturalizante que contiene 5 muestras de DNA genómico leucocitario flanqueadas por dos marcadores de peso molecular M1 y M2 (descritos anteriormente en la sección de material y métodos), que permiten determinar el tamaño de las bandas del DNA amplificado generadas por cortes GCG<sup>3</sup>C con la enzima de restricción Hha I y que se localizan en los carriles marcados con signo (+), mientras el DNA amplificado sin digerir está marcado con signo (-). El DNA sin digerir presenta 3

bandas sólomente: la primera que tiene un peso molecular aproximado de 200 pb, y las dos restantes que corresponden a los oligonucleótidos F4 y F6, mientras que los DNA's digeridos presentan un patrón de bandas que va de 6 a 8 bandas; de éstos, el DNA con 6 bandas posee pesos moleculares de 91, 48, 37, 35, 19 y 15 pb y pertenece al genotipo E-3/3 representado por los carriles 1+ y 5+; enseguida se muestran dos patrones con 7 bandas cada uno, y sólo difieren en la segunda banda que es más pesada, ya que el genotipo E-4/3 (carril 4+) posee bandas de 91, 72, 48, 37, 35, 19 y 15 pb, mientras que el genotipo E-3/2 (carril 3+) muestra bandas de 91, 83, 48, 37, 35, 19 y 15 pb; el último genotipo es el E-4/2 (carril 2+), que presenta las bandas de 91, 83, 72, 48, 37, 35, 19 y 15 pb. Nótese que los cuatro genotipos comparten las bandas de 15 a 48 pb y la de 91 pb; de éstas, las de 35 y 37 pb corresponden a los oligonucleótidos F4 y F6 del blanco, empleados en la amplificación del DNA, mismos que sufren hibridaciones entre ellos mismos, y que se observan también en los carriles con DNA genómico no digerido. Las bandas intermedias (72 y 83 pb) son las que marcan la diferencia entre los genotipos, ya sea, por su ausencia (en el caso de E-3/3), por presencia de alguna de las dos bandas (72 pb para E-4/3 y 83 pb para E-3/2), o la presencia de las dos bandas (E-4/2). La figura 20 muestra todas las combinaciones de los tres alelos ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ) del gen APO E, mientras que la fotografía de la figura 21 sólo contiene los patrones de bandas que dan origen a cada uno de los genotipos de apo E en nuestra población.

#### IV.6. Análisis de genotipos.

Los resultados fueron tabulados para determinar las frecuencias genotípicas (tabla 5) y alélicas (tabla 6) del gen APO E, y, posteriormente, aplicar la prueba de chi cuadrada ( $\chi^2$ ) para comparar las frecuencias genotípicas y alélicas más representativas entre hombres y mujeres mediante tablas de contingencia 2 X 2 (tabla 7). De acuerdo con los resultados de la tabla 5, se observa que el genotipo E-3/3 es el más frecuente en población mexicana, siendo su valor de 82.3 %; éste es más común en hombres (85.0 %) que en mujeres (79.6 %), sin embargo, no existe diferencia significativa ( $p = 0.05$ , tabla 7).

Tabla 5. Frecuencias genotípicas del gen APOE en población mexicana.

Genotipo	Frecuencias genotípicas		
	Mujeres n (%)	Hombres n (%)	Población total n (%)
4/3	14 (15.0)	10 (10.8)	24 (12.9)
3/3	74 (79.6)	79 (85.0)	153 (82.3)
3/2	4 (4.3)	4 (4.3)	8 (4.3)
4/2	1 (1.1)	0	1 (0.5)

El segundo genotipo de mayor frecuencia en la población es el E-4/3 con un valor de 12.9 %, del cual el 15 % corresponde a individuos de sexo femenino y 10.8 % de sexo masculino; nuevamente, la diferencia entre ambos sexos no es estadísticamente significativa ( $p=0.05$ , tabla 7). El siguiente genotipo es el E-3/2, con una frecuencia de 4.3 % en la población, siendo el 4.3 % en mujeres y 4.3 % en hombres; se observa que estas frecuencias entre hombres y mujeres son iguales, no así el genotipo E-4/2 que sólo tiene una frecuencia de 0.5 % en toda la población, estando sólo presente en el grupo femenino.

Tabla 6. Frecuencias alélicas del gen APOE en población mexicana.

Genotipo	n	$\epsilon_2$	$\epsilon_3$	$\epsilon_4$	Total $\epsilon^*$
3/3	153	0	306	0	
4/3	24	0	24	24	
3/2	8	8	8	0	
4/2	1	1	0	1	
Total	186	9	338	25	372
Frecuencias		0.024	0.909	0.067	
Mujeres	93	0.027	0.893	0.081	
Hombres	93	0.022	0.926	0.054	

$\epsilon^*$ , representa la sumatoria de los totales para cada alelo.

En la tabla 6 se observan las frecuencias alélicas que indican qué tan frecuentemente se halla presente uno de los tres alelos en la población, y se encontró que el alelo  $\epsilon_3$  tiene una frecuencia del 90.9 % en la población; estos datos son muy similares en hombres y en mujeres, sin embargo, el alelo  $\epsilon_4$ , que tiene una frecuencia general de 6.7 %, se presenta más frecuente en mujeres (8.1 %), mientras que en hombres esta frecuencia se ve disminuida a 5.4 %. Esta diferencia entre sexos respecto al alelo  $\epsilon_4$  podría indicar que el alelo  $\epsilon_4$  es más frecuente en mujeres que en hombres, sin embargo, el análisis estadístico demuestra que no existe diferencia significativa entre hombres y mujeres respecto al alelo  $\epsilon_4$  del gen APOE (tabla 7). El alelo  $\epsilon_2$  es el menos frecuente en nuestra población con un valor de 2.4 %, y se presenta con las frecuencias similares en hombres y mujeres.

**Tabla 7. Análisis estadístico de las diferencias entre frecuencias genotípicas y alélicas más representativas entre mujeres y hombres de la población mexicana.**

	<i>Genotipos</i>		<i>Alelo</i>
	<i>E-1/1</i> <i>n (%)</i>	<i>F-1/1</i> <i>n (%)</i>	<i>1/1</i> <i>n (%)</i>
<i>Mujeres</i> <i>(n=93)</i>	14 (15.0)	74 (79.6)	15 (8.1)
<i>Hombres</i> <i>(n=93)</i>	10 (10.8)	79 (85.0)	10 (5.4)
$\chi^2$	0.785	0.933	1.20

Valores de  $\chi^2$ :  $p=0.05$

## V. DISCUSSION

## V.1. Comparación con otros estudios

En todo el mundo se han desarrollado investigaciones sobre las frecuencias alélicas del gen de la apo E, y se han encontrado variaciones interesantes entre los diferentes grupos raciales (Tabla 8). En la mayoría de las poblaciones que se han estudiado, el genotipo E-3/3 ha sido el más común y la frecuencia con la que aparece oscila en un rango de 50 % (Nueva Zelanda) (Mahley y Rall, 1995) a 80 % (en nuestra muestra) de la población, con excepción de los Sudaneses en quienes la frecuencia del genotipo E-3/3 es muy baja (39.8 %) (Mahley y Rall, 1995). El segundo genotipo más frecuente es el E-4/3 con una frecuencia de -15 % (Caucásicos) (Tang, 1996) a -25 % (Nueva Zelanda) (Mahley y Rall, 1995); del cual nuestra muestra presenta una frecuencia de 12.9 % y los Chinos un valor similar (11.6 %); también, en las poblaciones de Sudán, Finlandia (Mahley y Rall, 1995; Hallman, 1991; Ehnholm, 1986), y los Africo-Americanos (Tang, 1996) residentes en Nueva York, se observa éste genotipo como el segundo de mayor frecuencia (35.9 %, 35.5 % y 35.7 % respectivamente), sólo que estos valores rebasan en mucho a las frecuencias normalmente encontradas, debido a que el alelo  $\epsilon 4$  tiene una frecuencia alta en éstas poblaciones (Sudán:  $\epsilon 4$ , 29.1 %;  $\epsilon 3$ , 61.9 %;  $\epsilon 2$ , 8.1 %; Africo-Americanos:  $\epsilon 4$ , 20.0 %;  $\epsilon 3$ , 73.0 %;  $\epsilon 2$ , 7.0 %; Finlandia:  $\epsilon 4$ , 24.4 %;  $\epsilon 3$ , 69.5 %;  $\epsilon 2$ , 6.2 %) (Mahley y Rall, 1995; Tang, 1996; Hallman, 1991). El tercer genotipo más frecuente es el E-3/2, para todas las poblaciones estudiadas, excepto en Japoneses, Chinos y Malayos donde fué el segundo más común (Hallman, 1991) (ver tabla 8), de las cuales, nuestra población tiene hasta el momento el valor más bajo (4.3 %). El genotipo de más baja frecuencia en nuestra población es el E-4/2, cuyo valor (0.5 %) coincide con las frecuencias determinadas en otras poblaciones, como los Malayos, Indúes, Japoneses y Caucásicos, salvo en la población de Sudán donde la frecuencia de E-4/2 es de 4.9 % por su elevada frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  (Mahley y Rall, 1995). Por otra parte, la población Iliispana de la ciudad de Nueva York no presenta éste genotipo (Schellenberg, 1995; Tang, 1996).

En la mayoría de las poblaciones se ha encontrado que las frecuencias de los alelos  $\epsilon 4$  y  $\epsilon 2$  son muy bajas, por lo que los genotipos E-4/4, E-4/2 y E-2/2 son muy raros, y la población mexicana no es la excepción ya que en nuestra población no se han encontrado individuos homocigotos para los alelos  $\epsilon 4$  y  $\epsilon 2$ ; lo mismo sucede con los resultados obtenidos por Tang y cols. (Tang, 1996), al estudiar las frecuencias de apo E en Caucásicos, puesto que no reportaron la existencia de genotipos E-4/4 y E-2/2; mientras que, Hallman y cols. reportaron la ausencia de homocigotos para el alelo  $\epsilon 2$  en la población de Islandia (Hallman, 1991). Hong y cols. (Hong, 1996), realizaron otro estudio en población China y encontraron que no hay homocigotos de  $\epsilon 4$  y  $\epsilon 2$ . Nuestros hallazgos son congruentes con éstas observaciones, y aún con las reportadas por Mak y cols. (Mak, 1996), (tabla 8) en donde se puede ver que hay baja frecuencia de éstos genotipos (E-4/4 y E-2/2).

Kamboh y cols. (Kamboh, 1995), compararon los genotipos de dos grupos culturales de Papúa Nueva Guinea: los Huli y los Pawaia. Los Huli son caracterizados por una frecuencia de  $\epsilon 4$  extremadamente alta, aproximadamente 7 veces más que en nuestra población; y baja frecuencia del alelo  $\epsilon 3$ , 2.5 veces menos que en nuestra población ( $\epsilon 3$ , 35.6 %;  $\epsilon 4$ , 49.0 %;  $\epsilon 2$ , 15.4 %). Los Pawaia tienen genotipo muy diferente al anterior pero similar a los negros ( $\epsilon 3$ , 60.3 %;  $\epsilon 4$ , 25.9 %;  $\epsilon 2$ , 13.8 %).

**Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas en diferentes poblaciones. Comparación con las frecuencias determinadas en población mexicana.**

Población	Frecuencias genotípicas					Frecuencias alélicas			
	E-1/4	E-1/3	E-3/3	E-3/2	E-2/2	E-1/2	$\epsilon 4$	$\epsilon 3$	$\epsilon 2$
USA	3.0	14.0	58.0	22.0	1.3	2.0	11.0	76.0	13.0
Canadá	3.9	20.6	61.8	9.8	2.0	2.0	13.2	77.0	7.8
Alemania	2.8	22.9	59.8	12.0	1.0	1.5	15.0	77.3	7.7
Escocia	1.0	24.8	58.3	12.8	0.5	2.8	15.0	77.0	8.0
Nueva Zelanda	0.9	25.1	51.4	20.0	1.4	1.2	14.1	73.9	12.0
Sudán	8.7	35.9	39.8	9.7	1.0	4.9	29.1	61.9	8.1
Africo-americanos	1.3	35.7	50.0	10.4	0.6	1.9	20.0	73.0	7.0
(Nueva York)									
Caucásicos (Nueva York)	0	17.0	69.6	12.5	0	0.9	9.0	84.0	7.0
Hispanos (Nueva York)	1.4	17.4	67.6	13.2	1.5	0	10.0	83.0	7.0
Islandia	3.2	23.2	60.0	10.3	0	3.2	16.4	76.8	6.8
Finlandia	5.9	35.5	46.8	9.9	0.5	1.5	24.4	69.5	6.2
Hungría	1.0	22.8	65.3	7.9	2.0	1.0	12.9	80.7	6.5
China*	1.1	11.6	69.5	15.3	1.6	1.1	7.5	83.0	9.8
China**	0	14.0	71.9	1.8	0	1.8	7.9	85.1	7.0
Japón	1.3	11.3	72.1	13.8	0.6	0.9	7.4	84.7	8.0
Indias (Singapur)	1.4	21.8	68.3	7.0	0.7	0.7	12.7	82.7	4.6
Malayos (Singapur)	3.4	16.1	60.2	16.9	2.5	0.8	11.9	76.7	11.4
Tyroleanos (Austria)	2.1	17.3	64.0	13.2	1.3	2.1	11.7	78.9	9.0
México <sup>§</sup>	0	12.9	82.3	4.3	0	0.5	6.7	90.9	2.4

\* Mak, 1996.

\*\* Hong, 1996.

§ Muestra de 186 individuos de la población mexicana.



En un estudio similar se comparan las poblaciones aborígenes de Australia y América, que se caracterizan por la ausencia del alelo  $\epsilon 2$ , mientras que las poblaciones de África y Oceanía se caracterizan por una frecuencia relativamente alta del alelo  $\epsilon 4$  (Kamboh, 1995).

La frecuencia del gen apo E en muchas poblaciones Europeas y Norte Americanas es muy homogénea ( $\epsilon 3$ , 76-79 %;  $\epsilon 4$ , 11-15 %;  $\epsilon 2$ , 6-10 %) (Roses, 1995), con la excepción de la población Finlandesa donde el alelo  $\epsilon 4$  es mucho más prevalente (Mahley y Rall, 1995; Ehnholm, 1986), y en nuestra población la frecuencia del alelo  $\epsilon 3$  es extremadamente alta (90.9 %), mientras que los alelos  $\epsilon 4$  y  $\epsilon 2$  tienen frecuencias bajas (6.7 % y 2.4 % respectivamente), tal y como lo reportaron Relkin y cols. al estudiar los fenotipos de apo E en una población Maya ( $\epsilon 3$ : 91.1 %,  $\epsilon 4$ : 8.9 % y  $\epsilon 2$ : 0.0 %) (Relkin, 1996).

Los Asiáticos (específicamente Chinos y Japoneses) tienen frecuencias relativamente altas de  $\epsilon 3$  (83-85 %), igual que los Mexicanos de nuestra población y los Mayas estudiados por Relkin y cols. En contraste, los Africanos de Sudán y Nigeria (Mahley y Rall, 1995) tienen bajo nivel de  $\epsilon 3$  (~61 %) y alto nivel de  $\epsilon 4$  (~30 %). Un estudio comparativo de los genotipos de apo E en negros y blancos en Estados Unidos revela que los negros se asemejan a los Sudaneses y Nigerianos ( $\epsilon 3$ , 80.3 % en blancos vs. 65.3 % en negros;  $\epsilon 4$ , 11.9 % en blancos vs. 23.2 % en negros;  $\epsilon 2$ , 7.7 % en blancos vs. 11.5 % en negros) (Mahley y Rall, 1995). Las frecuencias halladas en blancos se parecen a las Europeas y Norte Americanas, pero también difieren de nuestra población mexicana.

Se ha visto que la frecuencia de APO E- $\epsilon 4$  declina con la edad en los Caucásicos, y se atribuye a la alta mortalidad por enfermedades cardíacas, debido a los altos niveles de colesterol relacionados con el alelo  $\epsilon 4$  de la apo E (Cumming, 1984; Tsai, 1994; Tang, 1996). En contraste, la APO E- $\epsilon 4$  no predice niveles altos de colesterol y triglicéridos en niños y adultos de origen Africano (Tang, 1996). En nuestra población no existe diferencia significativa entre los individuos mayores de 60 años de edad y los que son menores de 60 años, respecto al alelo  $\epsilon 4$  del gen APO E. Con ésto se rechaza la sospecha de que no hay muchos individuos mayores de 60 años portadores del alelo  $\epsilon 4$  debido, tal vez, a que mueren por enfermedades cardíacas, por acúmulo de colesterol, antes de alcanzar ésta edad. Y como los individuos menores de 60 años también presentan baja frecuencia del alelo  $\epsilon 4$ , significa que el alelo  $\epsilon 4$  está distribuido en forma homogénea en nuestra población.

La frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  en esta muestra de la población mexicana es la más baja que se ha encontrado hasta el momento, sin embargo, ya se ha reportado la misma frecuencia ( $\epsilon 4$ : 6.7 %) en una población Japonesa (Relkin, 1996).

Aunque el alelo  $\epsilon 4$  es más frecuente en Africanos, los casos con EA de origen Caucásico tienen en mayor frecuencia el alelo  $\epsilon 4$  que los Africanos e Hispanos. Por el contrario, los Africanos tienen alto nivel de  $\epsilon 2$  pero no los Caucásicos e Hispanos en quienes la frecuencia de  $\epsilon 4$  es significativamente más alta en los casos con EA que entre los controles. Los casos con EA de origen Africano no tienen dosis elevada de  $\epsilon 4$ .

Se considera la posibilidad de que existan factores genéticos o ambientales no identificados que reducen el riesgo de EA entre los Africo-Americanos heterocigotos para APOE- $\epsilon$ 4 (Tang, 1996).

Como ya se ha visto, las frecuencias de APO E varían en diferentes poblaciones, y en Asiáticos, la frecuencia de  $\epsilon$ 4 es baja entre controles, principalmente en los Chinos y los Japoneses, lo cual coincide con nuestros datos. Por otro lado, se ha reportado que la frecuencia de APOE- $\epsilon$ 4 es más alta en mujeres que en hombres de origen Chino (Mak, 1996). Esto es muy importante ya que puede ser indicativo de que las poblaciones China y Mexicana tengan ancestros que probablemente compartían los mismos patrones genéticos para la apolipoproteína E, y que por alguna causa se dividieron en dos poblaciones completamente distintas. También es notable la semejanza, de la frecuencia aparentemente más alta del alelo  $\epsilon$ 4 en mujeres mexicanas que en hombres; aunque, estadísticamente no existe diferencia significativa entre hombres y mujeres (tabla 7), tal vez si se realiza el estudio en una población mayor pudiera existir diferencia significativa entre ambos sexos. De ser así, se obtendría un punto más a favor del argumento de que los Mexicanos nos parecemos a los Chinos respecto al gen APO E.

No sólo existe semejanza de nuestra población mexicana con los Chinos en cuanto al alelo  $\epsilon$ 4, también las frecuencias del alelo  $\epsilon$ 3 se parecen según lo reportan Hong y cols. (Hong, 1996), pues existe una frecuencia de 85.1 % para el alelo  $\epsilon$ 3 en Chinos, mientras que en Mexicanos la frecuencia de  $\epsilon$ 3 es de 90.9 %. Además de las semejanzas entre las frecuencias alélicas, de una y otra población (China y Mexicana), como ya se mencionó Hong y cols. reportaron que no hay individuos homocigotos para los alelos  $\epsilon$ 4 y  $\epsilon$ 2 en China, y lo mismo hemos encontrado en esta muestra de la población mexicana pues los genotipos E-4/4 y E-2/2 no están presentes en ella. Quizás la semejanza genética entre Chinos y Mexicanos sea mayor, tal vez las frecuencias de otros genes también resultan ser comunes para ambas poblaciones. Estos datos pueden ser de interés para todos aquellos interesados en la Antropología y el origen común de los hombres, y el por qué de la diversidad de razas; ya que existe una fuerte tendencia a pensar que el continente Americano fué colonizado por pobladores de Asia, hace muchos miles de años, quienes cruzaron el Estrecho de Bering y se dispersaron por todo el continente (Cavalli-Sforza, 1991). Según afirman, las poblaciones Asiáticas y las Americanas son comunes en su origen, y nuestros resultados pueden contribuir con éstas investigaciones; además, nuestros datos permiten conocer mejor la estructura genética de la población mexicana en lo que se refiere al gen APO E.. Lo cierto es que éstos resultados serán de utilidad para comparar la frecuencia del alelo  $\epsilon$ 4 en población mexicana que sufre de la Enfermedad de Alzheimer y poder establecer si este alelo es un factor de riesgo para desarrollar la EA en nuestra población.

## **VI. CONCLUSIONES**

- ◆ El gen de la apolipoproteína E está presente en sus tres isoformas en la población mexicana estudiada, de las cuales el alelo  $\epsilon 3$  es el más común (90.9 %), el alelo  $\epsilon 4$  es el segundo más frecuente (6.7 %) y el alelo  $\epsilon 2$  es el menos frecuente con un valor de 2.4 %.
- ◆ Esta muestra de la población mexicana presenta solamente cuatro genotipos del gen APO E: un genotipo homocigoto para el alelo  $\epsilon 3$  (E-3/3) con frecuencia de 82.3 %, y los genotipos heterocigotos E-4/3, E-3/2 y E-4/2 con frecuencias de 12.9 %, 4.3 % y 0.5 % respectivamente.
- ◆ La muestra de la población mexicana estudiada resultó ser muy similar a las poblaciones Asiáticas, en particular a los Chinos, debido a la elevada frecuencia del genotipo E-3/3; los valores de frecuencia para los genotipos E-4/3, E-3/2 y E-4/2 son muy similares y además, hay ausencia de los genotipos E-4/4 y E-2/2.
- ◆ La frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  está distribuida en forma homogénea en ambos sexos, y es la más baja reportada hasta la fecha en personas de origen mexicano. Para saber si el alelo  $\epsilon 4$  es un factor de riesgo para desarrollar la Enfermedad de Alzheimer en nuestra población, habrían que analizarse los genotipos de personas que padezcan la enfermedad y comparar sus frecuencias alélicas con las reportadas en este trabajo.

ESTA TESIS DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## VII. BIBLIOGRAFIA

Alonso, M.E. 1994. Genética de la Enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Psicología. Número Monográfico Especial*: 29-32.

Beisiegel, U., Weber, W. y Bengtsson-Olvecrona, G. 1991. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 8342-8346.

Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. y Stanley, K.K. 1989. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature.* **341**: 162-164.

Bleecker, M.L., Bolla-Wilson, K., Kawas, C. y Agnew, J. 1988. Age-specific norms for the Mini-Mental State Exam. *Neurology.* **38**: 1565-1568.

Blue, M.L., Williams, D.L., Stanley, Z., Ali Khan, S. y Blum, C.B. 1983. Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 283-287.

Borensztajn, J., Getz, G.S. y Kotlar, T.J. 1988. Uptake of chylomicron remnants by the liver: further evidence for the modulating role of phospholipids. *J. Lipid Res.* **29**: 1087-1094.

Cavalli-Sforza, L.L. 1991. Genes, Peoples and Languages. The family tree relating human populations corresponds to another relating the languages of the world. Both trees imply a series of migrations; the biological evidence indicates a homeland in Africa; *Scientific American. Noviembre*: 104-110.

Choi, S.Y., Fong, L.G., Kirven, M.J. y Cooper, A.D. 1991. Use of an Anti-Low Density Lipoprotein Receptor Antibody to Quantify the Role of the LDL Receptor in the Removal of Chylomicron Remnants in the Mouse *In Vivo*. *J. Clin. Invest.* **88**: 1173-1181.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, Jr. P.C., Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. y Pericak-Vance, M.A. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics.* **7**: 180-184.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. y Pericak-Vance, M.A. 1993. Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late-Onset Families. *Science.* **261**: 921-923.

Cumming, A.M. y Robertson, F.W. 1984. Polymorphism at the apoprotein E locus in relation to risk of coronary disease. *Clin. Genet.* **25**: 310-313.

Darnel, R.B. 1993. The Polymerase Chain Reaction: Application to Nervous System Disease. *Annals of Neurology*. 34(4): 513-523.

Das, H.K., McPherson, J., Bruns, G.A.P., Sotirios, K.K. y Breslow, J.L. 1985. Isolation, Characterization, and Mapping to Chromosome 19 of the Human Apolipoprotein E Gene. *J. Biol. Chem.* 260(10): 6240-6247.

Devlin, Thomas M. 1993. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. 3th edition. Wiley-Liss. New York. U.S.A.

Dewji, N.N. y Singer, S. J. 1996. Genetic Clues to Alzheimer's Disease. *Science*. 271: 159-160.

Doolittle, M.H., Wong, H., Davis, R.C. y Schotz, M.C. 1987. Synthesis of hepatic lipase in liver and extrahepatic tissues. *J. Lipid Res.* 28: 1326-1333.

Elshoubagy, N.A., Liao, W.S., Mahley, R.W. y Taylor, J.M. 1985. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 203-207.

Elshoubagy, N.A., Walker, D.W., Paik, Y.-K., Boguski, M.S., Freeman, M., Gordon, J.I. y Taylor, J.M. 1987. Structure and Expression of the Human Apolipoprotein A-IV Gene; *J. Biol. Chem.* 262(17): 7973-7981.

Ehnholm, Ch., Lukka, M., Kuusi Timo Nikkilä, E. y Utermann, G. 1986. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J. Lipid Res.* 27: 227-233.

Fainaru, M., Mahley, R.L., Hamilton, R.L. y Innerarity, T.L. 1982. Structural and Metabolic heterogeneity of  $\beta$ -very low density lipoproteins from cholesterol-fed dogs and from humans with Type III hyperlipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 23: 702-713.

Fazio, S., Lee, Y.-L., Ji, Z.-S. y Rall, Jr. S.C. 1993. Type III Hyperlipoproteinemic Phenotype in Transgenic Mice Expressing Dysfunctional Apolipoprotein E. *J. Clin. Invest.* 92: 1497-1503.

Francke, U., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. 1984. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: Synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 2826-2830.

Fredrickson, D.S., Levy, R.I. y Lees, R.S. 1967. Fat Transport in Lipoproteins - An Integrated Approach to Mechanisms and Disorders. *New England J. Medic.* 276: 34-39.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. y Hardy, J. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349: 704-706.

Hallman, D. M., Boerwinkle, E., Saha, N., Sandholzer, C., Menzel, H., Császár, A. y Uterman, G. 1991. The Apolipoprotein E Polymorphism: A Comparison of Allele Frequencies and Effects in Nine Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 338-349.

Hamilton, R.L., Wong, J.S., Guo, L.S.S., Krisans, S. y Havel, R.J. 1990. Apolipoprotein E localization in rat hepatocytes by immunogold labeling of cryothin sections. *J. Lipid Res.* 31: 1589-1601.

Havel, R.J. y Kane, J.P. 1995. Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins. Cap. 56. Scriver, C. R. Beaudet, A.L. Sly, W.S. y Valle, D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th edition. McGraw-Hill, Inc. New York. U.S.A. Vol. II. pp 1841-1846.

Havel, R.J. y Kane, J.P. 1973. Primary Dysbetalipoproteinemia: Predominance of a Specific Apoprotein Species in Triglyceride-Rich Lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70 (7): 2015-2019.

Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H. y Stanley, K.K. 1988. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *The EMBO J.* 7(13): 4119-4127.

Hixson, J.E. y Vernier, D.T. 1990. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J. Lipid Res.* 31: 545-547.

Holtzman, D.M. y Mobley, W.C. 1991. Molecular studies in Alzheimer's disease. *TIBS*. April 16. 140-144.

Hong, C.J., Liu, T.Y., Liu, H.-C., Wang, S.J., Fu, J.L., Chi, C.W., Lee, K.Y. y Sim, C. B. 1996.  $\epsilon 4$  Allele of apolipoprotein E increases risk of Alzheimer's disease in a Chinese population. *NEUROLOGY*. 46: 1749-1750.

Houlston, R.S., Snowden, C., Green, F., Alberti, K.G.M.M. y Humphries, S.E. 1989. Apolipoprotein (apo) E genotypes by polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes: non detectable linkage disequilibrium between apo E and apo C-II. *Hum. Genet.* 83: 364-368.



Jackson, C.L., Bruns, G.A.P. y Breslow, J.L. 1984. Isolation and sequence of a human apolipoprotein C II cDNA clone and its use to isolate and map to human chromosome 19 the gene for apolipoprotein C II. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 2945-2949.

Kamboh, M.I. 1995. Apolipoprotein E polymorphism and Susceptibility to Alzheimer's disease. Human Biology. 67 (2): 195-215.

Kamino, K., Orr, H.T., Payami, H., Wijsman, E.M., Alonso, M.E., Pulst, S.M., Anderson, L., O'dahl, S., Nemens, E., White, J.A., Sadovnick, A.D., Ball, M.J., Kaye, J., Warren, A., McInnis, M., Antonarakis, S.E., Korenberg, J.R., Sharma, V., Kukull, W., Larson, E., Heston, L.L., Martin, G.M., Bird, T.D. y Schellenberg, G.D. 1992. Linkage and Mutational Analysis of Familial Alzheimer Disease Kindreds for the APP Gene Region. Am. J. Hum. Genet. 51: 998-1014.

Kontula, K., Aalto-Setälä, K., Kuusi, T., Härmäläinen, L. y Syvänen, A.-C. 1990. Lipoprotein E Polymorphism Determined by Restriction Enzyme Analysis of DNA Amplified by Polymerase Chain Reaction: Convenient Alternative to Phenotyping by Isoelectric Focusing. Clin. Chem. 36 (12): 2087-2092.

Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Esser, V. y Brown, M.S. 1989. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 5810-5814.

Lehninger, A. L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. 1993. *Principles of Biochemistry with an Extended Discussion of Oxygen-Binding Proteins*. 2nd edition. Worth Publishers. New York. U.S.A. pp 480-482.

Levin, J. 1979. *Fundamentos de Estadística en la Investigación Social*. 2a edición. Ed. Harla. D. F. México. pp 169-194.

Mahley, R.W. 1988. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. Science. 243(29): 622-630.

Mahley, R.W. y Innerarity T.L. 1983. Lipoprotein receptors and Cholesterol homeostasis. Biochim. Biophys. Acta. 737: 197- 222.

Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C. y Weisgraber, K.H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. J. Lipid Res. 25: 1277-1289.

Mahley, R.W. y Rall, S.C. 1995. Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The Role of Apolipoprotein E in Normal and Abnormal Lipoprotein Metabolism. Cap. 61. Scriver, C. R. Beaudet, A.L. Sly, W.S. y Valle, D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th edition. McGraw-Hill, Inc. New York. U.S.A. Vol. II. p.p. 1953-1954.

Mahley, R.W., Weisgraber, K.H. y Innerarity, T.L. 1979. Interaction of plasma lipoproteins containing apolipoproteins B and E with heparin and cell surface receptors. *Biochem. Biophys. Acta.* 575: 81-91.

Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L. y Rall, S.C. 1991. Genetic Defects in Lipoprotein Metabolism. Elevation of Atherogenic Lipoproteins Caused by Impaired Catabolism. *JAMA* 265 (1): 78-83.

Mak, Y.T., Chiu, H., Woo, J., Kay, R., Chan, Y.S., Hui, E., Sze, K.H., Lun, C., Kwok, T. y Pang, C.P. 1996. Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease in Hong Kong elderly Chinese. *NEUROLOGY.* 46: 146-149.

Maniatis, T., Sambrook, J. y Fritsch, E.F. 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual.* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, Vol. 1. pp 6.36-6.44.

Marx, J. 1991. Alzheimer's Research Moves to Mice; The first mouse models for studying amyloid's role in Alzheimer's may help solve one of the most vexing issues in research on the neurodegenerative disease. *Science.* 253 (19): 266-267.

McPherson, M. J., Quirke, P. y Taylor, G.R. 1993. *PCR A Practical Approach*; Irl press. The Practical Approach Series. New York . U.S.A. pp 1-8.

Mishkel, M.A., Nazir, D.J. y Crowther, S. 1975. A longitudinal assessment of lipid ratios in the diagnosis of type III hyperlipoproteinemia. *Clin. Chim. Acta.* 58: 121-136.

Paik, Y.-K., Chang, D.J., Reardon, C.A., Davies, G.E., Mahley, R.W. y Taylor, J.M. 1985. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 3445-3448.

Rall, S.C., Weisgraber, K.H., Innerarity, T.L. y Mahley, R.W. 1982. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from tipe III hiperlipoproteinemic subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 4696-4700.

Rall, S.C., Weisgraber, K.H. y Mahley, R.W. 1982. Human Apolipoprotein E: The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 257(8): 4171-4178.

Relkin, N.R., Kwon, Y.J., Tsai, J. y Gandy, S. 1995. The National Institute on Aging/Alzheimer's Association Recommendations on the Application of Apolipoprotein E Genotyping to Alzheimer's Disease. Relkin, N.R., Khachaturian, Z. y Gandy, S. 1996. *APOLIPOPROTEIN E GENOTYPING IN ALZHEIMER'S DISEASE.* 1a. edición. The New York Academy of Sciences. New York. U.S.A. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES.* Vol. 802: 149-171.

Reyland, M.E., Gwynne, J.T., Forgez, P., Prack, M.M. y Williams, D.L. 1991. Expression of the human apolipoprotein E gene supresses steroidogenesis in mouse Y1 adrenals cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 2375-2379.

Roses, A.D. 1995. Apolipoprotein E Genotyping in the Differential Diagnosis, Not Prediction, of Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology.* 38 (1): 6-13.

Saunders, A. M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D., George-Hyslop, S.T., Pericak-Bance, M.A., Joo, S.H., Rosi, B.L., Gusella, J.F., Crapper-MacLachlan, D.R., Alberts, M.J., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D. y Roses, A.D. 1993. Association of apolipoprotein E allele  $\epsilon 4$  with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 43:1467-1468.

Schellenberg, G.D. 1995. Progress in Alzheimer's disease genetics. *Current Opinion in Neurology.* 8: 262-267.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Fonsin, J.-F., Bruni, A.C., Montesi, M.P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R.J., Wasco, W., Da Silva, H.A.R., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Tanzi, R.E., Roses, A.D., Fraser, P.E., Rommens, J.M. y St George-Hyslop, P.H. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 375: 754-760.

Shore, V.G. y Shore, B. 1973. Heterogeneity of Human Plasma Very Low Density Lipoproteins. Separation of Species Differing in Protein Components. *Biochemistry.* 12 (3): 502-507.

Simonet, W.S., Bucay, N., Pitas, R.E., Lauer, S.J. y Taylor, J.M. 1991. Multiple Tissue-specific Elements Control the Apolipoprotein E/C-I Gene Locus in Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 266 (14): 8651-8654.

Sing, Ch.F. y Davignon, J. 1985. Role of the Apolipoprotein E Polymorphism in Determining Normal Plasma Lipid and Lipoprotein Variation. *Am. J. Hum. Genet.* 37: 268-283.

Snowden, C., Houlston, R.S., Arif, M.H., Laker, M.F., Humphries, S.E. y Alberti, K.G.M.M. 1991. Disparity between apolipoprotein E phenotypes and genotypes (as determined by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta.* 196: 49-57.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S. y Roses A.D. 1993. Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type  $\epsilon 4$  allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 1977-1981.

Tang, M.-X., Maestre, G., Tsai, W.-Y., Liu, X.-H., Feng, L., Chung, W.-Y., Chun, M., Schofield, P., Stern, Y., Tycko, B. y Mayeux, R. 1996. Relative Risk of Alzheimer Disease and Age-at-Onset Distributions, Based on APO E Genotypes among Elderly African Americans, Caucasians, and Hispanics in New York City. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 574-584.

Tsai, M.-S., Tangalos, E.G., Petersen, R.C., Smith, G.E., Schaid, D.J., Kokmen, E., Ivnik, R.J. y Thibodeau, S.N. 1994. Apolipoprotein E: Risk Factor for Alzheimer Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 54: 643-649.

Utermann, G., Vogelberg, K.H., Steinmetz, A., Schoenborn, W., Pruin, N., Jaeschke, M., Hees, M. y Canzler, H. 1979. Polymorphism of apolipoprotein E. II. Genetics of hyperlipoproteinemia type III. *Clin. Genet.* 15: 37-62.

Utermann, G., Pruin, N. y Steinmetz, A. 1979. Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clin. Genet.* 15: 63-72.

Van Broeckhoven, C., Genthe, A.M., Vandenberghe, A., Horsthemke, B., Backhovens, H., Raeymaekers, P., Van Hul, W., Wehnert, A., Gheuens, J., Cras, P., Bruyland, M., Martin, J.J., Salbaum, M., Multhaup, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., Gurling, H.M.D., Mullan, M.J., Holland, A., Barton, A., Irving, N., Williamson, R., Richards, S.J. y Hardy, J.A. 1987. Failure of familial Alzheimer's disease to segregate with the A4-amyloid gene in several European families. *Nature.* 329: 153-155.

Walden, C.C. y Hegele, R.A. 1994. Apolipoprotein E in Hyperlipidemia. *Annals of Internal Medicine.* 120 (12): 1026-1036.

Wardell, M.R., Suckling, P.A. y Janus, E.D. 1982. Genetic variation in human apolipoprotein E. *J. Lipid Res.* 23: 1174-1181.

Wayne W.D. 1990. *Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud.* 3a. edición. Ed. Limusa. D.F. México. pp 459-489.

Weisgraber, K.H. 1990. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112. *J. Lipid Res.* 31: 1503-1510.

Weisgraber, K.H., Rall, S.C. y Mahley, R.W. 1981. Human E Apoprotein Heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the aminoacid sequence of the apo-E isoforms. *J. Biol. Chem.* 256(17): 9077-9083.

Wenham, P.R., Price, W.H. y Blundell, G. 1991. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *The Lancet.* 337 (11): 1158-1159.

Wernette-Hammond, M.E., Lauer, S.J., Corsini, A., Walker, D., Taylor, J.M. y Rall, S.C. 1989. Glycosylation of human Apolipoprotein E. The Carbohydrate Attachment Site Is Threonine 194. *J. Biol. Chem.* 264 (15): 9094-9101.

Wilson, Ch., Wardel, M.R. y Mahley, R.W. 1991. Three-Dimensional Structure of the LDL Receptor-Binding Domain of Human Apolipoprotein E. *Science.* 252 (28): 1817-1822.

Wirak, D.O., Bayney, R., Ramabhadran, T.V., Fracasso, R.P., Hart, J.T., Hauer, P.E., Hsiau, P., Pekar, S.K., Scangos, G.A., Trapp, B.D. y Unterbeck, A.J. 1991. Deposits of Amyloid  $\beta$  Protein in the Central Nervous System of Transgenic Mice. *Science.* 253 (19): 323-325.

Yu, Ch.-E., Payami, H., Olson, J.M., Boehnke, M., Wijsman, E.M., Orr, H.T., Kukull, W.A., Goddard, K.A.B., Nemens, E., White, J.A., Alonso, M.A., Taylor, T.D., Ball, M.J., Kaye, J., Morris, J., Chui, H., Sadovnick, A.D., Martin, G.M., Larson, E.B., Heston, L.L., Bird, T.D. y Schellemborg, G.D. 1994. The Apolipoprotein E/CII Gene Cluster and Late-Onset Alzheimer Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 54: 631-642.

Zannis, V.I. y Breslow, J.L. 1981. Human Very Low Density Lipoprotein Apolipoprotein E Isoprotein Polymorphism Is Explained by Genetic Variation and Posttranslational Modification. *Biochemistry.* 20: 1033-1041.

Zannis, V.I., Breslow, J.L., Utermann, G., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Havel, R.J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Schonfeld, G., Hazzard, W.R. y Blum, C. 1982. Proposed nomenclature of apo E isoproteins, apo E genotypes, and phenotypes. *J. Lipid Res.* 23: 911-913.

Zannis, V.I., Just, P.W. y Breslow, J.L. 1981. Human Apolipoprotein E Isoprotein Subclasses Are Genetically Determined. *Am. J. Hum. Genet.* 33: 11-24.

Zannis, V.I., McPherson, J., Golberger, G., Karathanasis, S.K. y Breslow, J.L. 1984. Synthesis, Intracellular Processing, and Signal Peptide of Human Apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* 259 (8): 5495-5499.

Zemlan, F.P., Vogelsang, G.D., McLaughlin, L. y Dean, G.E. 1994. Alzheimer's Paired Helical Filaments: Amyloid Precursor Protein Epitope Mapping. *Brain Research Bulletin.* 33: 387-391.