



11281



18

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**POLIMORFISMO DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN LA
POBLACIÓN MESTIZA E INDÍGENA DE MÉXICO, SU
RELACIÓN CON LOS NIVELES DE LÍPIDOS Y LA
SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE
ATEROSCLEROSIS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A

RICARDO GAMBOA AVILA

DIRECTOR DE TESIS: DR. GILBERTO VARGAS ALARCON

COTUTORES: DR. JULIO GRANADOS A.

DR. LUIS LLORENTE P.

MÉXICO, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Quiero dedicar este trabajo a todas aquellas personas que siempre me apoyaron incondicionalmente durante mi formación tanto personal como académica.

A mi familia:

Adriana por estar conmigo y acompañarme en este difícil pero satisfactorio camino del conocimiento y compartir este tiempo conmigo.

Natalia por su gran amor que es la razón de mi vida y quien siempre esta en mi pensamiento y mi corazón.

A mis Papas:

Por enseñarme a fijar y alcanzar siempre las metas, por su confianza y cariño.

A mis hermanos:

Sylvia Rebecca, Julian y Claudia por apoyarme en todo momento.

A todos mis sobrinos que son la alegría de la casa.

A mis eternos amigos: Ramón, Alejandro y Luis por esos momentos de aventura, apoyo y gran amistad incondicional.

A mi amiga Lourdes por su gran amistad.

Quiero agradecer a Claudia Huesca, Oscar Pérez y Edith Alvarez por su amistad y gran ayuda en este trabajo, por sus comentarios y apoyo.

De forma especial quiero dar las gracias al Dr. Gilberto Vargas por su confianza, apoyo y gran ayuda para este trabajo, por sus comentarios, orientación y amistad.

Al Dr. Julio Granados por su gran asesoría en mi formación académica

Al Dr. Fermín Valenzuela por iniciarme en este camino y a quien siempre le estaré agradecido

A todo el jurado por sus criticas y comentarios siempre valiosos

A todos mis compañeros del departamento de fisiología, pues de una u otra manera han participado en este trabajo y con quienes comparto gran parte de mi vida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	DR. FABIO SALAMANCA GOMEZ
SECRETARIO	DR. GILBERTO VARGAS ALARCON
VOCAL	DR. CARLOS POSADAS ROMERO
VOCAL	DR. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA
VOCAL	DR. JAIME MAS OLIVA
SUPLENTE	DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
SUPLENTE	DR. OSCAR PEREZ MENDEZ

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA,
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR Y CON LA COLABORACION DEL DEPARTAMENTO DE
ENDOCRINOLOGIA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ" BAJO LA
ASESORIA Y SUPERVISIÓN DEL DR. GILBERTO VARGAS ALARCON.

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) LA BECA
OTORGADA DURANTE EL ESTUDIO Y DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO PARA LA
OBTENCION DEL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DEL PRESENTE TRABAJO SE PUBLICARON TRES TRABAJOS Y TRES PRESENTACIONES EN CONGRESOS.

PUBLICACIONES:

Gamboa R, Hernández -Pacheco G, Hesiquio R, Zuñiga J, Granados J, Vargas-Alarcón G. *Polimorfismo de la apolipoproteína E y su asociación con enfermedades cardiovasculares*. Archivos del Instituto de Cardiología de México. 69: 375-382, 1999.

Gamboa R, Hernández-Pacheco G, Hesiquio R, Zuñiga J, Massó F, Montañón LF, Ramos-Kuri M, Estrada J, Granados J, Vargas-alarcón G. *Analysis of apolipoprotein E polymorphism in the Indian and mestizo population from México*. Hum Biology. 72:975-981,2000.

Gamboa R, Vargas-Alarcón G, Medina-Urrutia A, Cardoso-Saldaña G, Hernández-Pacheco G, Zamora-González J, Posadas-Romero C. *Influence of the apolipoprotein E polymorphism on plasma lipoproteins in Mexican population*. Hum Biology. 73 (6): 835-843, 2001.

CONGRESOS:

Polimorfismo de la apolipoproteína E en la población mestiza e indígena de México **Ricardo Gamboa**, Guadalupe Hernández-Pacheco, Ramiro Hesiquio, Joaquin Zuñiga, Julio Granados, Gilberto Vargas-Alarcón. .XXXVIII Reunión de la Sociedad Mexicana de la Nutrición y Endocrinología. Morelia, Michoacan. México.1998

Relación entre el polimorfismo de la apolipoproteína E y los niveles de lípidos en la población mexicana. **Gamboa Ricardo**, Parra CA, Galicia J Miguel, Vargas A Gilberto, Cardoso S Guillermo, Zamora G José, Hernández P Guadalupe, Posadas R Carlos...XXXIX Reunión de la Sociedad Mexicana de la Nutrición y Endocrinología. Merida Yucatán. Nov-Dic.1999

Relación entre los niveles de lípidos y el polimorfismo genético de la apolipoproteína E. **Ricardo Gamboa**, Yolanda Vergara, Guillermo Cardoso, José Zamora, Guadalupe Hernandez-Pacheco, Gilberto Vargas-Alarcón, Carlos Posadas. XXIV Congreso Nacional de Química Clínica, Boca del Río, Veracruz .Marzo, 2001.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	
Clasificación y composición de las lipoproteínas.....	8
Caracterización de la apolipoproteína E.....	13
Expresión genética de la apolipoproteína E.....	14
Polimorfismo de la apolipoproteína E.....	15
Estructura de la apolipoproteína E.....	17
Vías metabólicas que involucran a la apolipoproteína E.....	21
♦ Redistribución de lípidos entre las células de diferentes órganos	
I. El transporte de lípidos de la dieta desde el intestino hasta el hígado.....	22
II. Transporte de lípidos del hígado hacia los tejidos periféricos.....	23
III. Transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado.....	24
IV. Apolipoproteína E en la redistribución de los lípidos entre las células de un órgano o tejido	25
Polimorfismos de la apolipoproteína E sobre los niveles de lípidos y la enfermedad cardiovascular.....	29
Distribución de la apolipoproteína E en las distintas poblaciones.....	35
Justificación	37
OBJETIVOS	38
HIPÓTESIS	39
METODOLOGÍA	40
RESULTADOS	
CAPÍTULO I..Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en la población = de Mazatecos y Mestizos Mexicanos.....	47
CAPÍTULO II..Polimorfismo de la APO E y su relación con los niveles de lípidos.....	50
CAPÍTULO III..APO E y perfil lipídico en pacientes con enfermedad arterial coronaria.....	57
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	
I. Polimorfismo de la apolipoproteína E en la población Mestiza e Indígena de México.....	61

II. Polimorfismo de la apolipoproteína E y su relación con los niveles de lípidos.....	64
III. Polimorfismo de la apolipoproteína E y la susceptibilidad al desarrollo de la aterosclerosis.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	82

RESUMEN

La apolipoproteína E (apo E) es una proteína plasmática con un papel esencial en el movimiento de lípidos entre las células y sirve como ligando para los receptores de las lipoproteínas de baja densidad; participa en el transporte de triacilgliceroles desde el hígado hasta los tejidos periféricos. El gen de apo E codifica para tres alelos llamados *E2*, *E3*, y *E4*, los cuales difieren por la sustitución de un aminoácido en uno o dos de los sitios polimórficos (residuos 112 y 158). Se encuentran 6 fenotipos de apo E que son: apo *E2/2*, *E3/2*, *E3/3*, *E2/4*, *E3/4* y *E4/4*. Debido a la influencia que tienen los diferentes genotipos de apoE en los niveles de lípidos y su relaciones con enfermedades como la aterosclerosis, analizamos la distribución de sus frecuencias en la población Mexicana. Con el propósito de conocer la frecuencia de la apo E en nuestra población, se estudiaron 83 individuos Mestizos mexicanos y 75 individuos indígenas Mazatecos. Además, para conocer la influencia de la apo E sobre los niveles de lípidos se analizaron 278 individuos habitantes de la ciudad de México. Finalmente, para estudiar si existe una relación entre el polimorfismo de la apo E con la susceptibilidad genética al desarrollo de la aterosclerosis, se estudiaron a 197 pacientes con enfermedad arterial coronaria diagnosticada. Se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de la apo E por los métodos de secuenciación automatizada (utilizada para la estandarización de la técnica) y por PCR-RFLP. La cuantificación de los niveles de lípidos se llevó a cabo por técnicas estandarizadas automatizadas. La frecuencia de *APOE*3* fue 0.900 y de *APOE*4* de 0.100; para los Mazatecos, mientras que, para los Mestizos mexicanos la frecuencia de *APOE*3* fue 0.915 y de *APOE*4* de 0.084. Ningún individuo fue homocigoto para el alelo *APOE*2*. Al realizar el análisis de los niveles de lípidos de acuerdo al genotipo, se observó incremento en C-HDL en las mujeres portadoras del genotipo *E2/3* vs las portadoras del genotipo *E3/3* (53.7 ± 19.5 mg/dl vs 45.2 ± 12.0 mg/dl) ($p < 0.032$). Por otro lado, también se detectó incremento en C-LDL y colesterol total en mujeres con el genotipo *E3/4* (134.0 ± 31.7 mg/dl y 197.5 ± 35.4 mg/dl, respectivamente) al compararlas con las portadoras del genotipo *E3/3* (117.0 ± 28.0 mg/dl para C-LDL $p < 0.05$; y de 179.4 ± 33.4 mg/dl para colesterol total, $p < 0.01$). En los pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la población total en los valores de C-HDL en los genotipos *E3/4* vs *E3/3* y *E2/3* ($p < 0.05$). En conclusión, la distribución de los alelos de la apo E

en la población Mestiza e indígena de México son muy semejantes entre ellos, pero, muestran importantes diferencias al comparar con otros grupos étnicos. La frecuencia del alelo *E2* es de las más bajas reportadas en la literatura y parece ser que esta isoforma no se encuentra presente en las poblaciones indígenas Amerindias. El efecto del polimorfismo de la apo E en los niveles de lípidos solo fue demostrado en las mujeres portadoras de los genotipos *E2/3* y *E3/4*. En el caso de los pacientes con EAC este efecto fue observado solo en los portadores del genotipo *E2/3* quienes presentaron niveles altos de C-HDL.

INTRODUCCIÓN

CLASIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

El colesterol y sus ésteres, así como los triacilgliceroles y fosfolípidos son prácticamente insolubles en agua. No obstante, estos lípidos se transportan desde el tejido de origen (hígado, donde son sintetizados o intestino, donde son absorbidos) hasta los tejidos donde son almacenados o consumidos. Para transportar los lípidos en la sangre, estos son empaquetados en macromoléculas de forma esférica conocidas como lipoproteínas, las cuales están formadas por un centro de características hidrófobas en el cual están contenidos los triacilgliceroles y el colesterol esterificado, incluyen además una capa superficial más hidrófila que contiene colesterol no esterificado, fosfolípidos y proteínas específicas denominadas apolipoproteínas. Estas apolipoproteínas, además de tener funciones estructurales, pueden actuar como factores o activadores de enzimas, participan en el reconocimiento de las lipoproteínas por sus receptores y en la transferencia de lípidos entre diferentes lipoproteínas ¹ (Figura 1).

Las distintas lipoproteínas difieren entre sí por la proporción de colesterol, triacilgliceroles y fosfolípidos que contienen, así como por las distintas apolipoproteínas con las cuales se asocian. En la actualidad, las lipoproteínas plasmáticas han sido clasificadas de acuerdo a su densidad en: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, del inglés very low density lipoproteins), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, intermediate density lipoproteins), lipoproteínas de baja densidad (LDL, low density lipoproteins), y lipoproteínas de alta densidad (HDL, high density lipoproteins)¹ (Tabla 1). Así mismo, de acuerdo a su densidad

las HDL se han clasificado en HDL_{2a}, HDL_{2b} y HDL_{3a} y HDL_{3b} (densidad de 1.063-1.125 para HDL₂ y 1.125-1.210 mg/dl para HDL₃), aunque HDL_{2a} y HDL_{2b} tienen la misma densidad, las HDL_{2b} tienen como principal apolipoproteína la A-I (apo A-I). En cuanto a las LDL, Se han identificado 4 subclases (LDL I,II,III y IV) mediante electroforesis de gradiente de concentración en gel de poliacrilamida.

Cada clase de lipoproteína tiene una función específica, determinada por su sitio de síntesis, composición lipídica y contenido de apolipoproteínas. Los quilomicrones tienen la función de transportar la grasa exógena desde el intestino hasta el hígado, mientras el transporte de los lípidos desde el hígado hasta los tejidos periféricos y de aquí nuevamente hacia el hígado, se realiza a través de las VLDL, IDL, LDL y HDL que constituyen el denominado transporte de los lípidos endógenos ¹.

Cada una de las apolipoproteínas, tiene una función específica en el complejo macromolecular. Algunas de ellas únicamente son estructurales como la B-48, otras como la apo A-I, la apo A-IV y la apo C-I activan la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), otras como la apo C-II y C-III activan e inhiben, respectivamente, a la lipasa de lipoproteína (LPL). Finalmente, algunas de ellas actúan uniéndose a receptores específicos como ocurre con la apo B-100 y la apo E. Entre las lipoproteínas del plasma humano, existen por lo menos nueve apolipoproteínas diferentes, las cuales se distinguen por su tamaño, reacciones con anticuerpos específicos y distribución característica en las distintas clases de lipoproteínas (Tabla 2).

Una de estas apolipoproteínas, la apo E, es una proteína plasmática que sirve como ligando para los receptores de lipoproteínas de baja densidad (receptor LDL) y a través de su interacción con estos receptores, participa en el transporte de colesterol y otros lípidos entre las diferentes células del cuerpo. Esta proteína presenta tres isoformas principalmente, referidas

como apo E-2, apo E-3 y apo E-4, productos de tres alelos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) en el locus del mismo gen. El polimorfismo de la apo E se ha asociado con variaciones en los niveles de lípidos plasmáticos, así como en el riesgo de enfermedad arterial coronaria.

Tabla 1. Clasificación de las lipoproteínas.

Clase de Lipoproteína	Densidad (g/mL)	Mobilidad electroforética
Quilomicrones	<0.94	Origen
VLDL	0.94-1.006	Pre- β
LDL	1.019-1.063	β
HDL	1.063-1.210	α

VLDL = lipoproteína de muy baja densidad, LDL = lipoproteína de baja densidad

HDL = lipoproteína de alta densidad.

Tabla 2. Tipos de Apolipoproteínas plasmáticas.

Apolipoproteínas	Lipoproteína asociada	Función
ApoAI	HDL y Quilomicrones	Estructural y activa la LCAT
ApoAII	HDL y Quilomicrones	Estructural e inhibe la LCAT <i>in vitro</i>
ApoB48	Quilomicrones	Estructural
ApoB100	VLDL, LDL	Estructural y se fija al receptor LDL
ApoCI	VLDL, HDL, Quilomicrones	Activa la LCAT
ApoCII	Quilomicrones, VLDL, HDL	Activa la LPL
ApoCIII	Quilomicrones, VLDL, HDL	Inhibe la LPL
ApoD	HDL	Proteína de transferencia de lípidos
ApoE	Quilomicrones, VLDL, HDL	Estructural y ligando para receptor apoB/E

LCAT: Lecitina colesterol acil transferasa; LPL: Lipasa de lipoproteína



Figura.1 Composición y tamaño de las lipoproteínas plasmáticas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CARACTERIZACIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E

La apolipoproteína E (apo E) es una proteína plasmática identificada por primera vez en humanos en 1973 ². Posteriormente fue identificada y caracterizada en otras especies de las cuales se han derivado modelos para poder estudiar y caracterizar de manera extensa dicha apolipoproteína. La apo E es una glicoproteína de 299 aminoácidos rica en arginina, con un peso molecular de 34 200 D ¹. Se encuentra codificada en el cromosoma 19 y forma parte de la estructura de diversas lipoproteínas como los quilomicrones circulantes, los remanentes de quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad, las lipoproteínas de densidad intermedia y las lipoproteínas de alta densidad. La apo E tiene un papel esencial en el movimiento de lípidos entre los tejidos ³ y sirve como ligando para receptores de lipoproteínas de baja densidad; a través de su interacción con estos receptores participa en el transporte de colesterol y otros lípidos desde el hígado hasta los tejidos periféricos. Por su presencia en las lipoproteínas de alta densidad (HDL), participa en la redistribución del colesterol y de otros lípidos entre los tejidos y también parece estar involucrada en la reparación de tejidos dañados ¹. Se piensa que el complejo HDL-apo E también está involucrado en la liberación de colesterol HDL mediado por un receptor hacia el hígado ⁴, en la hidrólisis hepática mediada por una lipasa de los fosfolípidos HDL ⁵, en la esterificación del colesterol plasmático ^{6,7}, en el metabolismo postprandial de triacilgliceroles ⁸ y en el reflujo de colesterol derivado de células ^{9,10}

Otras funciones en las cuales también parece intervenir la apo E incluyen la inmunoregulación y modulación del crecimiento celular así como la diferenciación celular ³.

EXPRESIÓN GENÉTICA DE LA APO E

A diferencia de otras lipoproteínas importantes, las cuales son sintetizadas principalmente en el hígado y en intestino delgado, la apo E es producida por varios tejidos, sugiriendo que esta podría estar involucrada en otros procesos además del transporte de lípidos tradicional. Una gran cantidad de ARN mensajero de apolipoproteína E es encontrada en tejido hepático¹¹. Por otro lado, los pacientes que han recibido trasplantes de hígado adquieren el fenotipo sérico de la apo E del donador, sugiriendo que la mayoría de la apo E circulante es sintetizada en el hígado. La apolipoproteína E también es sintetizada en la glándula suprarrenal y en riñón^{11,12}. La expresión del gen de la apo E es regulada por múltiples elementos positivos y negativos dentro de la región del promotor.

El cerebro, después del hígado, es el órgano con mayor concentración de ARNm para la apo E¹¹. Se ha observado que, cuando se lleva a cabo el trasplante de hígado, la apo E encontrada en el fluido cerebro-espinal no cambia, indicando que es sintetizada localmente¹³. Otro tejido en el cual también se ha reportado la síntesis de apo E es el bazo³.

POLIMORFISMO DE LA APOLIPOPROTEÍNA E

El gen que codifica para la apo E está localizado en el brazo largo del cromosoma 19 en una familia de genes, donde están incluidos los genes para apo C-I, C-I' (un pseudogen) y C II ¹⁴. Dicho gen incluye 4 exones y tiene un tamaño de 3.7 Kb. El receptor de las LDL y de la apo CII también está localizado en este cromosoma ¹⁵. La secuencia promotora TATAATT se encuentra aproximadamente a una distancia de 30 pares de bases arriba del sitio de inicio de la transcripción.

El gen de apo E codifica para tres alelos llamados *E2*, *E3*, y *E4*, los cuales difieren entre sí por una unidad de carga neta debido a la sustitución de una base en dos codones en el cuarto exón del gene ^{13,16,17}. Debido a que estos alelos se heredan de forma mendeliana codominante, se encuentran 6 fenotipos de apo E que son: *apoE2/2*, *E3/2*, *E3/3*, *E4/2*, *E4/3* y *E4/4*, los cuales difieren por la sustitución de un aminoácido en uno o dos de los sitios polimórficos (residuos 112 y 158) ^{17,18}. La apo *E4* difiere de la apo *E3* en la sustitución de una arginina por una cisteína en el residuo 112, mientras que la *apoE2* difiere de la *apoE3* en la sustitución de una cisteína por una arginina en el residuo 158 (Figura 2). Debido a la similitud en los efectos fisiológicos de los diferentes alelos de esta proteína, éstos son comúnmente agrupados en el alelo *E2* (que incluye los genotipos *2/4*, *2/3* y *2/2*), el grupo del alelo *E3* (que incluye el fenotipo *3/3*) y el grupo del alelo *E4* (que incluye los fenotipos *4/4* y *4/3*).

Iniciador F6

4 DNA **taagcttG** GCG CGG CTG TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CAG GCC CGG CTG GGC 53

4 proteína Ala Arg Leu Ser Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly

112
TGC
TGC
Cys
Cys

4 GCG GAC ATG GAG GAC GTG CGC GGC CGC CTG GTG CAG TAC CGC GGC GAG GTG CAG GCC ATG 113

4 Ala Asp Met Glu Asp Val Arg Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met

Cys
Cys

4 CTC GGC CAG AGC ACC GAG GAG CTG CGG GTG CGC CTC GCC TCC CAC CTG CGC AAG CTG CGT 173

4 Leu Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg lys Leu Arg

158
TGC
CGC
Arg
Arg
Cys

Iniciador F4

4 AAG CGG CTC CTC CGC GAT GCC GAT GAC CTG CAG AAG CGC CTG GCA GTG TAC CAG GCC GGG 233

4 Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly

4 GCgaattctgt 244

A

	APOE*2	APOE*3	APOE*4
Posición 112	Cisteina (TGC)	Cisteina (TGC)	Arginina (CGC)
Posición 158	Cisteina (TGC)	Arginina (CGC)	Arginina (CGC)

B

Figura 2. Secuencia de DNA y de la proteína de la región amplificada de la apolipoproteína E. A. En la parte superior, se indican las bases y en la inferior los aminoácidos, ambos correspondientes para el alelo E4. En las posiciones 112 y 158 se indican los cambios en la secuencia correspondientes para E2 y E3. En negritas se indican los iniciadores (F4 y F6) B. Muestra los cambios del aminoácido en ambas posiciones (112 y 158) para cada uno de los alelos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTRUCTURA DE LA APOLIPOPROTEÍNA E.

La apo E sirve de ligando para varios receptores celulares y promueve el catabolismo de los remanentes lipoproteicos que contienen apo E. Mutaciones en la apo E pueden alterar la unión de las lipoproteínas que contienen apo E con el receptor de las LDL, las cuales pueden estar asociadas con la aterosclerosis prematura. Por lo tanto, la estructura de la apo E es importante para determinar la afinidad de unión con las lipoproteínas y como resultado, en los niveles de lípidos. Una característica en la estructura de todas las apolipoproteínas es la región α -hélice anfipática, caracterizada por una cara compuesta por residuos no polares y la otra por residuos polares, esta estructura es importante para la unión con lípidos^{1,19}. A través de estudios fisicoquímicos en la apolipoproteína E, se han identificado dos dominios estructurales independientes con diferentes funciones^{1,19}. La región amino-terminal (1-191) que contiene el dominio de unión al receptor y la región carboxi-terminal que interactúa con la superficie de las lipoproteínas^{1,19}. El dominio de unión al receptor ha sido localizado y caracterizado por diversos estudios^{1,19,20}. Inicialmente, se estableció que el número de residuos de arginina y lisina en la apo E (y también en la apo B) era esencial en la unión con el receptor de LDL. Una modificación química selectiva de los residuos de arginina o de lisina inhibían completamente la unión de la apo E con el receptor de LDL *in vitro*¹⁹⁻²⁰. Por otro lado, una modificación en estos residuos de arginina o lisina en las lipoproteínas que contienen apo E, retrasan su remoción plasmática, indicando la importancia de estos residuos en la apo E sobre el catabolismo lipoprotéico vía el receptor de las LDL. Los residuos de aminoácidos de la apo E involucrados en la unión con el receptor han sido estudiados mediante diferentes métodos: 1) Identificando y secuenciando

mutantes naturales de la apo E con defectos en la unión con el receptor. 2) Generando fragmentos de apo E y estudiando su actividad de unión con el receptor. 3) Por la ubicación del epítopo utilizando un anticuerpo monoclonal para apo E que bloquea la unión de las lipoproteínas que contienen apo E. 4) Produciendo formas mutantes de la apo E por mutagénesis dirigida. Obviamente, la aparición de las variantes con defectos en la unión con el receptor han sido muy importantes para conocer su estructura. Casi todas las mutaciones de la apolipoproteína E reportadas en personas con hiperliproteinemia tipo III presentan una unión anormal con el receptor; e involucran residuos entre los sitios 136 al 146. Esta información ha ayudado a localizar el dominio de unión con el receptor en la cercanía de los residuos 140 al 160. A través de estudios de cristalografía por rayos X, se determinó la estructura tridimensional del dominio amino-terminal de la apolipoproteína E (Figura 3). El dominio de unión al receptor fue encontrado entre los residuos 136 al 160, en una parte de la hélice con un potencial electrostático positivo¹⁹. Sin embargo, los aminoácidos que se encuentran más alejados de los residuos 136 al 160 también tienen un papel importante en la unión al receptor. La región de unión al receptor es abundante en aminoácidos neutros. La región entre los residuos 131 al 150 presenta una α -hélice, conteniendo el sitio de unión al receptor. Los residuos 151 al 154 forman un sitio β -doblado, seguido por la forma β -plegada entre los residuos 155 al 164. Se conoce que una variación en la posición 158 reduce la afinidad de unión, por la alteración en la conformación molecular de la región. En estudios realizados por mutagénesis dirigida, se ha observado que el cambio de aminoácidos básicos a aminoácidos neutros disminuyen la afinidad de unión de un 10% al 50 % de lo normal. Debido a estos estudios, se conoce ahora que la isoforma *APOE**2 tiene una afinidad de unión hacia el receptor del 1 al 2% menor que la isoforma *APOE**3 y solo difiere de *E3* en una base en la posición 158¹⁹. Estudios de variantes truncadas de la apo E sugieren que

los residuos en la región 171 a 183 son necesarios para la unión normal con el receptor ²¹. Estos aminoácidos pueden contribuir a una estructura más ordenada y estable o al alineamiento de los residuos en el sitio de unión al receptor ¹⁹⁻²¹.

VÍAS METABÓLICAS QUE INVOLUCRAN A LA APOLIPOPROTEÍNA E

La apolipoproteína E es una de las principales proteínas involucradas en el catabolismo de lipoproteínas ricas en triacilgliceroles (VLDL), las cuales tienen la función de transportar triacilgliceroles desde el hígado hacia los tejidos periféricos, mientras que las HDL participan en la redistribución de colesterol entre las células. La apo E está presente en los quilomicrones sintetizados en el intestino, quienes transportan los triacilgliceroles y el colesterol provenientes de la dieta. El principal papel fisiológico de la apo E en el metabolismo de las lipoproteínas es su capacidad para mediar la unión de las lipoproteínas que contienen apo E con el receptor LDL, también referido como receptor apo B/E. La apo E actúa como ligando para dos tipos de receptores: el receptor de "remanentes" y el receptor a apo B/E.

Existen diferentes vías metabólicas que involucran a la apo E en la regulación de los niveles de lípidos, las cuales se pueden dividir en tres categorías. Dos de estas incluyen vías bien caracterizadas que involucran el transporte de lípidos mediados por apo E, mientras que la tercera vía es mucho más especulativa y aparentemente involucra otros mecanismos además de la función del transporte de lípidos. Para poder entender el papel de la apo E en la distribución de colesterol y triacilgliceroles entre las células, es importante conocer las vías metabólicas que están involucradas en la distribución de lípidos en los diferentes órganos. El primero de ellos es el transporte de lípidos provenientes de la dieta desde el intestino hacia el hígado y los tejidos periféricos (vía exógena). El segundo es el transporte de los lípidos desde el hígado hasta los tejidos periféricos (vía endógena) y el tercero, que es de los tejidos periféricos hacia el hígado (transporte reverso de colesterol).

REDISTRIBUCIÓN DE LÍPIDOS ENTRE LAS CÉLULAS DE DIFERENTES ÓRGANOS.

1) EL TRANSPORTE DE LÍPIDOS DE LA DIETA DESDE EL INTESTINO HASTA EL HÍGADO Y TEJIDOS PERIFÉRICOS (VÍA EXÓGENA).

Las grasas contenidas en los alimentos que ingerimos, no pueden ser absorbidas directamente por el intestino, al llegar al duodeno son catabolizadas por la enzima colesterol esterasa y por la lipasa pancreática, generándose ácidos grasos y colesterol. Los ácidos grasos pasan a los enterocitos del intestino delgado donde la enzima esterasa los une al glicerol formando los triacilgliceroles, los cuales se ensamblan con pequeñas cantidades de colesterol, apolipoproteína B-48, A-I, y fosfolípidos para formar los quilomicrones. Los quilomicrones sintetizados por el intestino posteriormente entran en el ducto linfático torácico y mesentérico, donde adquieren la apo CII y la apo E (Figura 4). En el plasma, la lipasa de lipoproteína cataliza la hidrólisis de los triacilgliceroles de los quilomicrones y los ácidos grasos generados, recapturados inicialmente por los adipocitos, donde son almacenados en vesículas de triacilgliceroles. Después de la hidrólisis de los triacilgliceroles, los quilomicrones se convierten en pequeñas partículas las cuales son enriquecidas con ésteres de colesterol que proviene de las HDL por acción de la CETP, transformandolas en remanentes de quilomicrones. Los remanentes de quilomicrones son rápidamente conducidos hacia el hígado, en donde el colesterol es utilizado para formar parte de las membranas o en la biosíntesis lipoproteica o excretado como colesterol libre o ácidos biliares. La apolipoproteína E es responsable de mediar la recaptura de los remanentes de quilomicrones la cual se une al receptor apo E o de remanentes de quilomicrones ^{1, 16-17}.

La captura de remanentes de quilomicrones por el hígado puede ser un proceso que involucre varios pasos en la unión de los remanentes de quilomicrones en el espacio de Disse y la recaptura

por los hepatocitos.¹⁸ Además la hidrólisis de los lípidos y su transferencia dentro de los hepatocitos puede llevarse a cabo mientras las partículas se encuentran en el espacio de Disse. Sin embargo, el mecanismo preciso en la captura de los quilomicrones remanentes requiere mayor estudio, aunque se conoce que esta captura está mediada por la apo E.

II) TRANSPORTE DE LÍPIDOS DESDE EL HÍGADO HACIA LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS (VÍA ENDOGENA).

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) se sintetizan en el aparato de Golgi de los hepatocitos a partir de ácidos grasos, glicerol y pequeñas cantidades de colesterol. En el plasma, éstas actúan por la lipasa de lipoproteína que utiliza apo C-II, la cual cataliza la liberación de ácidos grasos, convirtiéndola en una partícula cada vez más pequeña y más enriquecida con colesterol, formando los remanentes de VLDL que dan lugar a las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y finalmente a las LDL, que es el paso final de la cascada. Sin embargo, durante este proceso lipolítico, una parte de los remanentes de VLDL así como las IDL son captadas por el hígado y eliminadas del plasma a través del receptor apoB/E. Las LDL son captadas por el hígado o por los tejidos periféricos a través del receptor de LDL (Figura 4)

III) TRANSPORTE DEL COLESTEROL DESDE LOS TEJIDOS PERIFÉRICOS HACÍA EL HÍGADO (TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL).

La eliminación del colesterol del cuerpo se da inicialmente a través del hígado, vía formación de la bilis^{22,23}. Por lo tanto, es esencial que el colesterol de los tejidos periféricos sea transportado de regreso al hígado. Este proceso es llamado “transporte reverso del colesterol”, el cual involucra a las HDL, como el principal transportador. Las HDL se sintetizan en el hígado e intestino delgado, y son secretadas a la circulación en forma de HDL nacientes ó discoideas²² (Figura 5). Además, estas pueden formarse como resultado de la interacción de membranas plasmáticas con apo-AI que es secretada junto con pequeñas cantidades de fosfolípidos y colesterol. La enzima LCAT localizada en la superficie de la HDL naciente esterifica el colesterol proveniente de células periféricas que al incorporarse al núcleo de la partícula la transforma en una HDL esférica la HDL₃. Una minoría de las HDL que contienen apo-AI como única apoproteína, son las principales aceptoras de colesterol extracelular. Entre más colesterol libre sea esterificado por lecitina:colesterol acil transferasa (LCAT), la HDL₃ se va haciendo más grande, esférica y madura, rica en ésteres de colesterol²²⁻²⁴. Los ésteres de colesterol se intercambian por TG de las lipoproteínas que contengan apo-B (quilomicrones, VLDL, IDL, LDL), por medio de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP)²⁵⁻²⁹. Este proceso transforma la HDL₃ en HDL₂ que por la actividad de fosfolipasa de la lipasa hepática pierde fosfolípidos y los ésteres de colesterol son depositados en el hepatocito mediante el receptor para apo-AI. Así la HDL₂ se transforma de nuevo en HDL₃

IV) APOLIPOPROTEÍNA E EN LA REDISTRIBUCIÓN DE LÍPIDOS ENTRE LAS CÉLULAS DENTRO DE UN ÓRGANO O TEJIDO.

Las HDL con apo E o el complejo de lípidos con apo E puede funcionar enviando colesterol a las células en un medio ambiente local donde ellas son formadas. Así, la apo E puede participar en la redistribución de colesterol de las células con exceso de colesterol a otras que requieren colesterol. Las células que requieren colesterol pueden expresar niveles altos de receptores LDL y recapturar las partículas que contienen apo E.

Algunos modelos propuestos involucran el almacenaje coordinado y la redistribución de colesterol entre células de nervios periféricos con daño o proceso de regeneración³⁰⁻³². Después del corte del nervio ciático de la rata, la producción y acumulación de la apo E aumenta de 100 a 200 veces más que en un nervio sin daño. La apo E extracelular puede alcanzar hasta un 5% del total de la proteína soluble en el segmento de la regeneración. La producción de apo E alcanza un máximo en 7 a 10 días después del daño y disminuye lentamente a sus condiciones basales después de 8 semanas, cuando la regeneración del nervio ciático de la rata ha finalizado.

Las células responsables de la producción de la apo E en esta situación son los macrófagos³². Inmediatamente después del daño, los macrófagos que están en el nervio ciático secretan apo E. Además, como parte de la reacción inflamatoria, los macrófagos llegan rápidamente al sitio de daño, atraen a más macrófagos y empieza la producción de apo E. La degeneración del axón y la destrucción de la mielina se llevan a cabo rápidamente. La mayoría del colesterol y otros lípidos importantes, son retenidos dentro del área de degeneración y acumulados en las células de Schwann y en los macrófagos.

Como la regeneración del axón crece hacia el tubo neuronal, continua expresando altos niveles de receptores LDL en la punta de crecimiento ³². Probablemente los receptores participan en la recaptura de colesterol para su utilización en la biosíntesis de la membrana. El colesterol puede provenir de los macrófagos locales que están cargados con lípidos o de los desechos celulares. Este modelo en nervio puede describir un proceso más general que se da en mayor o menor grado en varios tejidos en respuesta al daño y la reparación. Evolutivamente hablando, parece que la naturaleza diseñó un sistema para la captura y el almacenamiento del colesterol y posiblemente de otros lípidos y la redistribución en las células que requieren colesterol para su biosíntesis. Así, la apolipoproteína E y el receptor de las LDL tiene un papel fundamental en este proceso.

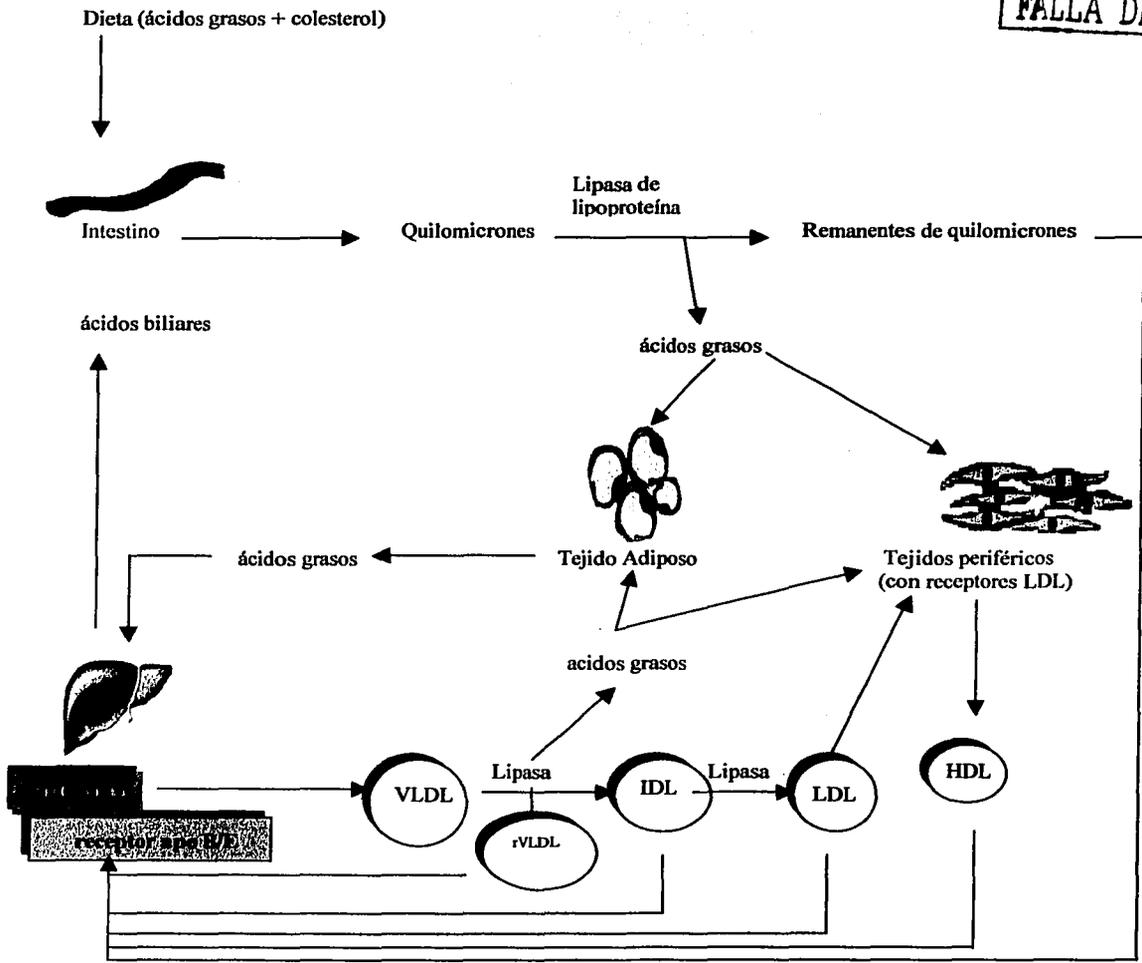
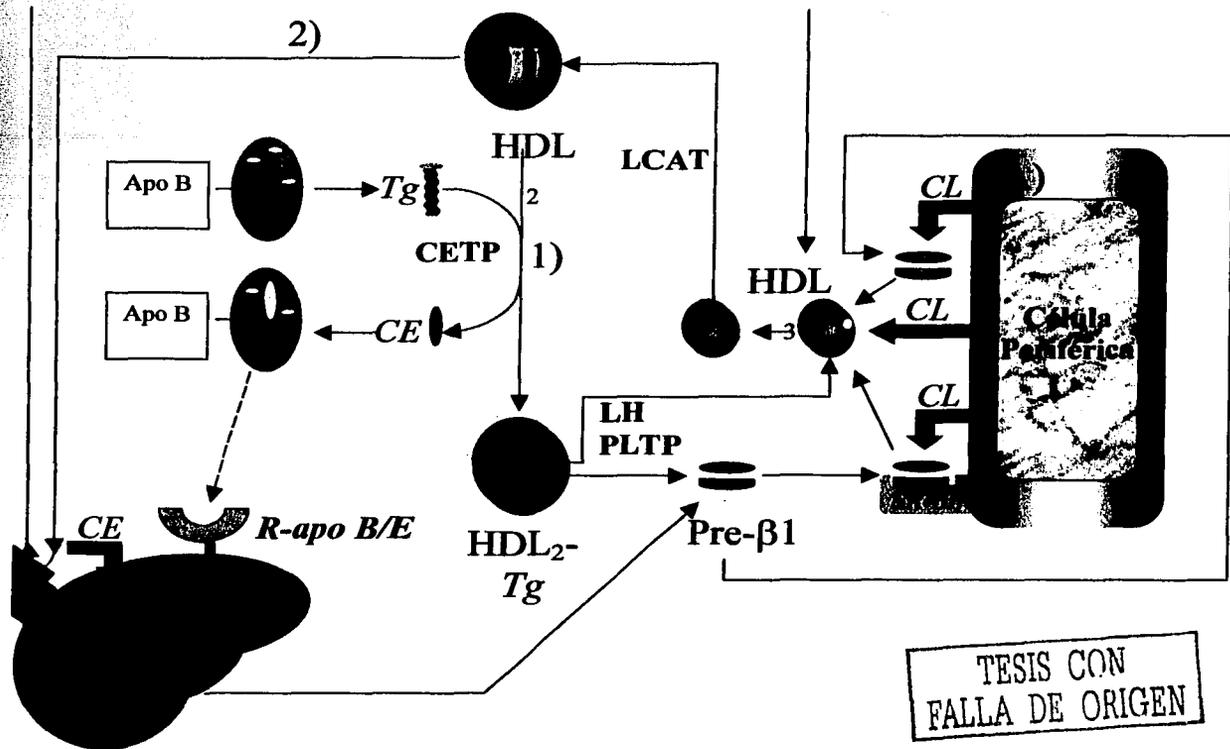


Figura 4. Esquema general del metabolismo de los Quilomicrones, VLDL ,IDL, LDL, HDL y Remanentes de quilomicrones.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Esquema del mecanismo del transporte reverse de colesterol. Los aceptores primarios (pre-β1 o HDL3) captan el colesterol de las células periféricas por A) contacto con la membrana celular, o B) por medio del receptor SR-BI. La incorporación y esterificación de colesterol por la LCAT, generan HDL3 y HDL2. El colesterol esterificado puede seguir dos rutas: 1) por acción de la CETP es intercambiado por triacilgliceroles provenientes de lipoproteínas que contienen apo B llegando al hígado, gracias al receptor hepático apo B/E o, 2) es eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en que interviene el receptor hepático SR-BI. La LH hidroliza los triacilgliceroles de las HDL captados por la ruta 1). Esta hidrólisis en asociación con la actividad PLTP, regenera los aceptores primarios. Tomado de Pérez-Méndez, 2000.

POLIMORFISMOS DE LA APOLIPOPROTEÍNA E SOBRE LOS NIVELES DE LÍPIDOS Y LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La enfermedad cardiovascular (ECV), la cual incluye la enfermedad ateromatosa coronaria (EAC) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países industrializados. Los principales factores de riesgo incluyen la edad, sexo, hipertensión, diabetes, C-LDL elevado (≥ 160 mg/dl, 4 mmol/l), y disminución de C-HDL (< 35 mg/dl, 0.9 mmol/l). Un factor adicional importante son los antecedentes familiares de daño coronario prematuro^{33,34}

Diversos estudios han asociado a los niveles de lípidos con la enfermedad cardiovascular. Algunas de las mutaciones comunes en la población en general han incluido la participación del locus de la apo E. Estudios poblacionales han tratado de explicar esta variación genética de la apo E como el principal modulador de colesterol total y C-LDL.

Como ya se mencionó, la apo E tiene tres alelos comunes que codifican para tres isoformas *E2*, *E3* y *E4*. La combinación de estos tres alelos da por resultado los seis fenotipos, entre los que están tres homocigotos *E2/2*, *E3/3* y *E4/4* y tres heterocigotos *E3/2*, *E4/3* y *E4/2*.

La presencia de alguno de los alelos mencionados se han asociado con alteraciones en los niveles de colesterol total y C-LDL en la población en general. Estudios a nivel poblacional, indican que los individuos que presentan el alelo *E2* muestran una deficiencia en la unión de las lipoproteínas con el receptor para apo E, esto se ha asociado con niveles bajos de colesterol total y el desarrollo de hiperlipoproteinemia³⁵⁻³⁷. Por otro lado, los individuos que tienen el alelo *E4* presentan una mayor afinidad de unión de las lipoproteínas con el receptor para apo E, y se ha asociado con concentraciones elevadas de colesterol total y de C-LDL en el plasma, lo que a su vez también está asociado con un incremento en el riesgo de daño coronario³⁸⁻⁴².

Se ha reportado una alta frecuencia del alelo *E4* en pacientes con enfermedad coronaria e infarto al miocardio en algunas poblaciones estudiadas. De la misma manera, los individuos que presentan este alelo tienen una frecuencia mayor de calcificación aórtica que los que presentan cualquiera de las otras dos variantes (*E2* o *E3*)⁴³. Por otro lado, la presencia de ciertos fenotipos como *E4/4* y *E4/3* se asocia con incremento en los niveles de C-LDL, mientras que dichos niveles están disminuidos en individuos con los fenotipos *E3/2* y *E2/2*. Finalmente, parece existir un gradiente de asociación de los fenotipos *E3/4*, *E3/3* y *E3/2* con la presencia de lesiones ateroscleróticas en algunas poblaciones, siendo la más fuerte con el fenotipo *E3/4*^{35,36}.

Se sugiere que la presencia del alelo *E2* provoca la disminución de C-LDL debido a una disminución en la remoción de remanentes de quilomicrones por el hígado y un aumento en la actividad del receptor de LDL, mientras que, el alelo *E4* provoca un aumento en los niveles de C-LDL debido a un incremento en la captura de remanentes de quilomicrones y una disminución en la actividad del receptor LDL. Un meta análisis realizado por Dallongeville y cols.⁴⁴ mostró que los sujetos con los alelos *E2* y *E4* presentan niveles más elevados de triacilgliceroles que aquellos sujetos con el alelo *E3*. Estas alteraciones sobre los niveles de lípidos indican que la variación en el locus de la apo E puede influir de manera importante en el riesgo de enfermedad arterial coronaria (EAC) en la población en general.

Varios trabajos han demostrado la asociación entre la EAC y el polimorfismo de la apo E, utilizando diseños de casos-control⁴⁵⁻⁵⁵, así como las variables de edad, sobrevivientes de infarto al miocardio, historias familiares de EAC, angiografías y estudios de autopsia.

En otro meta-análisis realizado por Wilson y cols.⁴², el riesgo relativo asociado al alelo *E2* (0.98) fue menor en comparación al alelo *E4* (1.26), en ambos sexos, lo que indicó que la presencia del alelo *E4* confiere una mayor riesgo para la ECV. Sin embargo, el efecto protector del alelo *E2* es

controversial ya que algunos estudios sugieren que el alelo *E2* puede estar asociado con el riesgo de ECV de manera dependiente del sexo y la edad, y puede también estar influenciado por factores ambientales ⁵⁶⁻⁶⁰. Algunos estudios han asociado al alelo *E2* con lipemia posprandial elevada, por lo que la influencia del alelo *E2* sobre el riesgo de ECV puede ser debido a las altas concentraciones de lipoproteínas ricas en triacilgliceroles las cuales son aterogénicas ⁶¹. Sin embargo, esta asociación solo se ha observado en hombres. Una posible explicación a estos hallazgos del potencial aterogénico asociado con las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles pueden ser expresadas debido a los bajos niveles de C-HDL encontrado en los hombres, mientras que, en las mujeres, el efecto aterogénico de las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles puede ser contrarrestada por niveles elevados de C-HDL. Otro posible mecanismo que se postula es por la relación entre la resistencia a la insulina, lipemia posprandial y los estrógenos. Se ha mostrado que los estrógenos aumentan la expresión de los niveles de RNAm de la apo E. Este incremento en la expresión de apo E, puede dar lugar a un aumento en la secreción de apo E y por lo tanto, una remoción de los remanentes más eficiente en las mujeres premenopausicas ⁶². Esta hipótesis se apoya en estudios en conejos trigliceridemicos, donde los niveles elevados de apo *E2* provocan una hiperlipidemia y una aterosclerosis más severa en machos con respecto a las hembras ⁶³. Un tratamiento con estrógenos en estos conejos transgénicos machos, normalizó el perfil lipídico. Por otro lado, los conejos transgénicos hembras que se ovariectomizaron incrementaron significativamente los niveles de las lipoproteínas consideradas aterogénicas. Parece ser que, los estrógenos son responsables en gran medida de las diferencias de los niveles de lípidos y procesos ateroscleróticos dependiendo del género, observado en este modelo animal.

La variabilidad en las asociaciones reportadas y el genotipo de la apo E con el riesgo de EAC pueden ser afectadas por diferentes factores que alteran la asociación entre el genotipo de la apo

E y los niveles de lípidos en plasma. Entre estos factores pueden estar involucrados la dieta y las terapias farmacológicas^{64,65}. Estas interacciones pueden explicar los niveles elevados de C-LDL en una dieta alta en colesterol con el alelo *E4*. Efectos similares con la apo E se han reportado para la presión arterial y en terapias dietéticas⁶⁶. Sin embargo, varios autores^{67,68} sugieren que una dieta baja en grasas suprime el efecto deletéreo del alelo *E4* en el perfil lipídico. Estudios llevados a cabo en dos poblaciones indígenas de México (Purepechas y Mayas) reportaron que no encontraron una correlación entre los genotipos *E3/3* y *E3/4* con la concentración de C-LDL, lo cual indica que posiblemente, pueda deberse al estilo de dieta tradicional de la región, la cual es baja en grasas. Este estilo de vida puede interactuar con la susceptibilidad genética de la apo E y así determinar los niveles de lípidos en el plasma. Efectos similares entre el estilo de vida y los niveles de lípidos han sido reportados para otras poblaciones^{69,70}.

Por otro lado, a través de estudios epidemiológicos se ha demostrado que la incidencia de daño en arterias coronarias está inversamente relacionado con la concentración de lipoproteínas de alta densidad en el plasma (HDL)^{71,72}. Se piensa que las HDL inhiben la aterogénesis debido a que promueven un exceso en el flujo de colesterol desde los macrófagos cargados de lípidos⁷² y mediante el transporte del exceso de colesterol desde el plasma hacia el hígado por una excreción eventual en la bilis (proceso referido como transporte reverso de colesterol, Figura 5)^{73,74}. Las HDL también intervienen en otras funciones anti-aterogénicas como es la remoción plasmática de lipoproteínas ricas en triacilgliceroles (TLR)⁷⁵, inhibición en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)⁷⁶ y la inhibición en la expresión de células de adhesión endotelial.

El polimorfismo de la apo-E en la susceptibilidad a diversas enfermedades principalmente el infarto al miocardio y enfermedades coronarias ha tomado gran relevancia y ha sido evaluada en diversas poblaciones utilizando grupos control del mismo origen étnico (Tabla 3). Dichos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

datos muestran que el porcentaje de pacientes con problemas cardiovasculares que muestran el fenotipo *E4/4* es igual o excede la proporción observada en los sujetos control. Similarmente, el fenotipo *E3/4* es más común en los pacientes que en los controles. Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de los fenotipos *E2/2* o *E2/3* al comparar los pacientes con los sujetos control. Esto sugiere que el alelo *E4* presenta una asociación con la ECV y algunos autores indican una mayor incidencia en los hombres, aunque existe una disparidad entre los estudios⁴². Estos resultados son controversiales dependiendo del origen étnico de los sujetos de estudio, además como ya se mencionó, la presencia de otros factores de riesgo pueden influir en la enfermedad.

Finalmente, cabe mencionar que la apolipoproteína E, también se ha relacionado con otras enfermedades como son las nefropatías y el Alzheimer. Este último ha tomado gran importancia ya que se ha observado una fuerte relación entre la enfermedad de Alzheimer y el alelo *E4*.

Varios investigadores han planteado la hipótesis que el alelo *E4* puede estar asociado con episodios de pérdida de memoria en personas mayores, aunque los mecanismos de esta asociación aún no son claros⁴³.

Tabla 3. Distribución de los Fenotipos de la Apo-E en Pacientes Masculinos con IM o EIC y su Comparación con Sujetos Control.

Referencia	Enfermedad	Casos n	Fenotipos de la Apo-E %					
		Controles n	E2/2	E2/3	E3/3	E3/4	E2/4	E4/4
Cumming 1984 ⁴⁸	IM	194	0	7.2	55.2	4.6	30.4	2.6
		400*	0.5	12.7	58.3	2.7	24.8	1.0
Lenzen 1986 ⁴⁹	IM	470	0.2	8.9	63.2	1.8	23.9	2.1
		624	1.2	10.7	63.0	3.2	19.9	2.1
Eto 1989 ⁵⁰	EIC	55	1.8	10.9	52.7	0	30.9	3.6
		576*	0.3	6.1	71.9	0.7	19.3	1.7
Yamamura 1990 ⁵¹	EIC	156	1.3	7.7	70.5	0.6	15.4	4.5
		208*	0.5	11.6	68.3	1.0	17.8	1.0
Eichner 1993 ⁵²	EIC muerte	206	0.5	11.7	53.4	1.9	29.6	2.9
	o IM	412*	0.5	8.5	67.0	1.0	20.6	2.4
Luc 1994 ⁵³	IM	574	0.5	9.4	61.3	2.4	23.2	3.1
		680	0.9	13.5	62.9	2.1	18.5	2.1
Wilson 1994 ⁵⁴	EIC	145	1.4	15.2	52.4	2.8	23.4	4.8
		889	0.6	3.5	62.2	2.1	19.0	2.6
Stengard 1995 ⁵⁵	EIC muerte	28	0	3.6	57.1	7.1	28.6	3.6
		269	0	5.6	69.5	1.5	22.7	0.7
Stengard 1995 ⁵⁶	EIC muerte	43	0	2.3	41.8	7.0	48.8	0
		326	0	8.9	58.9	4.0	28.2	0

Fenotipos de la apo E, EIC e IM en hombres. * El sexo de los sujetos control no fue especificado, y el mismo grupo control fue utilizado para la comparación de EIC entre hombres y mujeres.

IM: Infarto al miocardio; EIC, Enfermedad isquémica coronaria.

DISTRIBUCIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN LAS DISTINTAS POBLACIONES

Debido a la influencia que tienen los diferentes fenotipos de apo E en los niveles de lípidos y su relaciones con enfermedades como la aterosclerosis, se ha analizado la distribución de sus frecuencias en diversas poblaciones ^{67, 68,77-88}. Los datos reportados a la fecha establecen que el alelo más frecuente en todas las poblaciones estudiadas es el *E3* y por tanto el fenotipo más común es el *E3/3*; sin embargo, la frecuencia tanto del alelo como del fenotipo varía según la población estudiada. Existe una mayor diferencia en las frecuencias de los alelos *E2* y *E4* así como en los fenotipos en los cuales están incluidos dichos alelos, las cuales varían importantemente en los distintos grupos étnicos estudiados. Los individuos caucásicos en general presentan una frecuencia más alta de *E2*, mientras que las poblaciones africanas presentan una frecuencia alta del alelo *E4*. Por su parte, las poblaciones indígenas americanas estudiadas hasta la fecha básicamente presentan las frecuencias más elevadas de *E3* ^{67,68,88} y algunas de ellas principalmente las sudamericanas presentan también frecuencia alta del alelo *E4* ^{78,85,86}. El alelo *E2* no existe en poblaciones aborígenes de Groenlandia y de Australia, mientras que se ha reportado su alta frecuencia en poblaciones Chinas y en aborígenes de Malasia y Nueva Guinea ^{77,80,83,85}. Por su parte, la frecuencia del alelo *E4* es alta en poblaciones de Groenlandia, Finlandia y en aborígenes de Malasia, Nueva Guinea y Australia. La frecuencia de *E4* es baja en poblaciones Chinas, Turcas, Italianas, Españolas y Griegas ^{77,79,81,84,85}. En Europa, se ha reportado un gradiente de la frecuencia del alelo *E4* siendo alta en poblaciones del norte y baja en poblaciones del sur, sucediendo lo contrario con la frecuencia del alelo *E3*.

Estos datos nos muestran una gran diversidad en las frecuencias tanto alélicas como genotípicas de la apo E en la población mundial. Esto nos indica la importancia de estudiar

poblaciones con poco grado de mestizaje, para poder entender mejor la participación de la apo E sobre los niveles de lípidos y por lo tanto en el desarrollo de la aterosclerosis. Las poblaciones indígenas de nuestro país, son un buen modelo de estudio, debido al bajo grado de mestizaje que presentan. Este grado de mestizaje está corroborado por estudios realizados con algunos marcadores genéticos como los del HLA, además de estudios realizados por el Instituto Nacional Indigenista, el cual integra a estos grupos étnicos de acuerdo a su características de lenguaje, vestimenta y rasgos físicos, entre otros. El conocimiento de estas frecuencias en la población indígena de México puede ayudarnos a conocer, por un lado, el grado de mestizaje en nuestra población, conocer la relación con otros grupos indígenas amerindios. Por otra parte, permitiría, tratar de correlacionar estas frecuencias genéticas de la apo E con la incidencia de enfermedad aterosclerótica. Si existe una relación. entonces se podría utilizar a la apo E como marcador genético de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

En nuestra población existe muy poca información acerca de los genes que participan en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Como ya se ha mencionado la apolipoproteína E tiene un papel fundamental en los niveles de lípidos, principalmente en el C-LDL y C-HDL los cuales participan activamente en la generación de estas enfermedades. En nuestra población son muy escasos los trabajos relacionados con el polimorfismo de genes que participan en la susceptibilidad a EAC y en particular con la apolipoproteína E y los niveles de lípidos. No existe reporte, hasta la fecha, que relacione el polimorfismo de la apo E y los niveles de lípidos, con la incidencia de la EAC en nuestra población. Esto hace importante el estudio del polimorfismo de la apo E en la población Mexicana, debido a la variabilidad en su frecuencia genética en las distintas poblaciones y su impacto sobre los niveles de lípidos y la aterosclerosis. En la población Mexicana se conocen 56 grupos indígenas clasificados en 5 troncos lingüísticos, el conocer el polimorfismo de estos genes en las poblaciones indígenas, nos puede brindar información acerca de la mezcla genética de nuestra población (tanto indígena como Mestiza) y poderlos utilizar como marcadores genéticos para la susceptibilidad de algunas enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis.

OBJETIVOS

Debido a la importancia que parecen tener los genotipos de apo E en la susceptibilidad a desarrollar algunas enfermedades de cardiovasculares, los objetivos del presente trabajo fueron:

- 1) Estandarizar una técnica rápida y confiable para definir las variantes polimórficas de la apolipoproteína E.
- 2) Determinar la frecuencia de las distintas variantes de la apolipoproteína E en la población mestiza e indígena Mexicana, específicamente en un grupo indígena de origen Mazateco
- 3) Una vez definidas estas frecuencias, compararlas con las de otras poblaciones previamente estudiadas con el fin de conocer las diferencias y semejanzas.
- 4) Cuantificar los niveles de lípidos y observar su relación con las distintas isoformas presentadas en la población mestiza.
- 5) Estudiar la participación del polimorfismo de la apolipoproteína E en la susceptibilidad genética al desarrollo de aterosclerosis en la población Mexicana.

HIPÓTESIS:

De acuerdo a lo reportado en otras poblaciones de origen Amerindio, esperamos encontrar en la población indígena de Mazatecos, una frecuencia baja para el alelo *E2* y *E4* y una frecuencia alta para el alelo *E3*; mientras que para la población Mestiza, debido al mestizaje dado principalmente durante la conquista en el siglo XVI, esperamos una frecuencia más alta con respecto a los indígenas para los alelos *E2* y *E4*, semejante a la de las poblaciones caucásicas.

Debido a que los alelos *E2* y *E4* se han relacionado con dislipidemias, se espera encontrar una relación entre el alelo *E2* con niveles bajos de C-LDL y altos de C-HDL y de forma inversa, para el alelo *E4* niveles altos de C-LDL y bajos de C-HDL

Si el alelo de susceptibilidad a la enfermedad arterial coronaria es el apo E4, entonces se espera encontrar una frecuencia mayor de este alelo en los pacientes con enfermedad cardiovascular diagnosticada que en los individuos control

METODOLOGIA:

El estudio se dividió en tres fases, por lo cual los sujetos de estudio variaron en cada una de ellas.

Sujetos de estudio (1ra fase): Se estudiaron 83 individuos Mestizos Mexicanos, habitantes de la Ciudad de México (40 hombres y 43 mujeres): El criterio de inclusión fue que tanto ellos como sus últimas dos generaciones, hubiesen nacido en México. Un Mestizo mexicano es definido como una persona nacida en México quien es descendiente de un habitante autóctono de la región y de individuos, principalmente Españoles Caucásicos, quienes llegaron a América durante el siglo XVI.

Para su comparación, una muestra de 75 individuos (35 hombres y 40 mujeres) del grupo étnico Mazateco, habitantes del pueblo de Huautla de Jiménez y San Mateo Yoloxochitl en el estado de Oaxaca, fueron incluidos en esta parte del estudio. Los pueblos fueron seleccionados después de revisar los datos del Instituto Nacional Indigenista (INI). El criterio de inclusión fue: ser hábitante autóctono de la región, así como sus padres y abuelos tanto maternos como paternos.

Los Mazatecos son habitantes del norte de Oaxaca y de algunas áreas del estado de Veracruz, están clasificados lingüísticamente dentro del grupo Olmeca-Otomi, subgrupo Otomiano-Mixteco, y la familia Popoloca ⁹². Actualmente, existen cerca de 100,000 individuos quienes pertenecen a este grupo étnico, 66.25% son bilingües y 33.75% son monolingües (datos obtenidos del Instituto Nacional Indigenista, México) ⁹³. A cada individuo se le tomó una muestra de sangre venosa periférica (10 ml) en tubos con EDTA (1mg/ml) y fueron almacenados a 4°C hasta su utilización.

de sangre venosa periférica (10 ml) en tubos con EDTA (1mg/ml) y fueron almacenados a 4°C hasta su utilización.

Sujetos de Estudio (2da. fase): Se estudiaron a 278 individuos (200 mujeres y 78 hombres) profesores de escuelas públicas y privadas de la Ciudad de México, quienes estuvieron de acuerdo en participar en este estudio; tomados aleatoriamente, se les practicó una historia médica indicando su sexo, edad, lugar de nacimiento, antecedentes familiares y hábitos alimenticios. Además se les tomaron medidas antropométricas e índice de masa corporal y una muestra sanguínea (10 ml) en tubos con EDTA (1mg/ml) (Tomados por el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"). A este grupo de individuos se les determinaron los niveles de lípidos: colesterol total (CT), colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL), colesterol asociado a lipoproteínas de muy baja densidad (C-VLDL), triacilgliceroles y glucosa.

Sujetos de Estudio (3ra fase): Se estudiaron a 197 pacientes con infarto al miocardio diagnosticado en el departamento de Endocrinología y Hemodinámica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", a cada uno se les determinaron los niveles de lípidos (CT, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triacilgliceroles) y glucosa. Además se tomó una muestra sanguínea (10 ml) en tubos con EDTA (1mg/dl)

Extracción del DNA: El DNA genómico se obtuvo a partir de 10 ml. de sangre periférica de cada individuo utilizando la técnica de expulsión salina. (ver en Anexos)

Amplificación de los fragmentos polimorficos de la apo E: Se utilizaron los iniciadores
F4 (5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3')
F6 (5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3')

descritos por Emi y colaboradores⁸⁹. El DNA obtenido de cada individuo se amplificó por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mezcla de reacción incluyó: 1 µg de DNA, 1 pmol/µl de cada iniciador, 20µM de cada deoxinucleotido trifosfatado (dNTP), 2 mM de MgCl₂, 10% de dimetilsulfóxido, 1X de solución amortiguadora (buffer) de reacción y una unidad de *Taq polimerasa* en un volumen total de 25µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer 9700) a 95°C-20 seg, 60°C-30 seg y 72°C-1:15 min. 30 ciclos. Después de la amplificación, cada muestra se verificó en un gel de agarosa al 2%. (ver anexos)

Fragmentos de restricción polimorficos (RFLPs): 17µl de cada amplificado se digirieron utilizando de 5 a 10 unidades de la enzima *Hha I/Cfo I* incubando durante toda la noche a 37 °C. Finalmente, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% durante 6 horas a una corriente constante de 88 Volts. Después de la electroforesis, el gel se reveló con nitrato de plata. (ver anexos). El gel se muestra en la figura 6, mostrando los diferentes isoformas encontradas.

Secuenciación directa: Esta técnica se realizó para comprobar el genotipo de la apo E y estandarizar la técnica de PCR-RFLP, por lo tanto, se utilizaron muestras tipificadas previamente por la técnica de PCR-RFLP, las cuales nuevamente se amplificaron por PCR con los mismos iniciadores (F4 y F6) y siguiendo las mismas condiciones experimentales. Cada producto fue corrido en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% y se recortó para su posterior purificación mediante el “estuche PCR preps Wizard” (Promega, Madison, WI, USA). Posteriormente, los productos purificados fueron medidos en un espectrofotómetro y ajustados para su secuenciación amplificando con un estuche comercial que incluye los dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia y usados como terminadores de la cadena (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA). Los parámetros de la PCR de secuenciación fueron como sigue: desnaturalización a

96°C durante 10 segundos; alineación a 50°C durante 5 segundos y extensión a 60°C durante 4 minutos (25 ciclos). Finalmente, los productos amplificados fueron nuevamente purificados precipitando con etanol y posteriormente incorporados en el secuenciador automático Perkin Elmer 310 (Foster City, CA. USA). En la figura 7 se muestran la secuencia para la apo E, indicando los sitios polimórficos para cada una de ellas. Cada una de las secuencias corresponde a un polimorfismo distinto.

Determinación de lípidos: Después de un ayuno de 10 a 12 h, con el paciente en posición sedente durante 20 min y sin estasis venosa, se colectaron 10 ml de sangre en un tubo con EDTA (1mg/ml). El plasma se separó por centrifugación a 2500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C.

El perfil de lípidos se determinó a través de análisis de laboratorio por métodos enzimáticos estandarizados. El colesterol total y los triacilgliceroles fueron determinados por métodos enzimáticos estandarizados (Roche-Syntex/Boheringer Mannheim) en un autoanizador Hitachi 705. La concentración de colesterol HDL se determinó después de precipitar a las lipoproteínas que contenían apoB con fosfotugsnato- $MgCl_2$. La determinación de las lipoproteínas de baja densidad se estimó a través de la fórmula de Friedewald⁹⁰. Todas las pruebas fueron realizadas bajo estricto de control de calidad, mediante la participación del laboratorio de lípidos del Instituto Nacional de Cardiología certificado por el programa "Lipid Standarization Program, Center for Disease Control en Atlanta, GA USA".

Análisis estadístico: Las frecuencias tanto alelicas como genotípicas de las variantes de la apo-E fueron obtenidas por conteo directo. Además, el equilibrio de Hardy-Weinberg se obtuvo a través de un programa computacional ARLEQUIN. Para los datos de índice de masa corporal (IMC), HDL, LDL, VLDL y triacilgliceroles así como para el análisis de genotipos de la

apo E sobre los lípidos y lipoproteínas, se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) y t de student no pareada para comparar los valores medios, y análisis de χ^2 . Todos los análisis se llevaron a cabo separadamente en hombres y mujeres. Todas las variables se expresaron como media \pm DE. Cuando la probabilidad de que la diferencia, debida al azar, fuera menor de 5% ($p < 0.05$) se consideró significativa. El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS v. 9.0

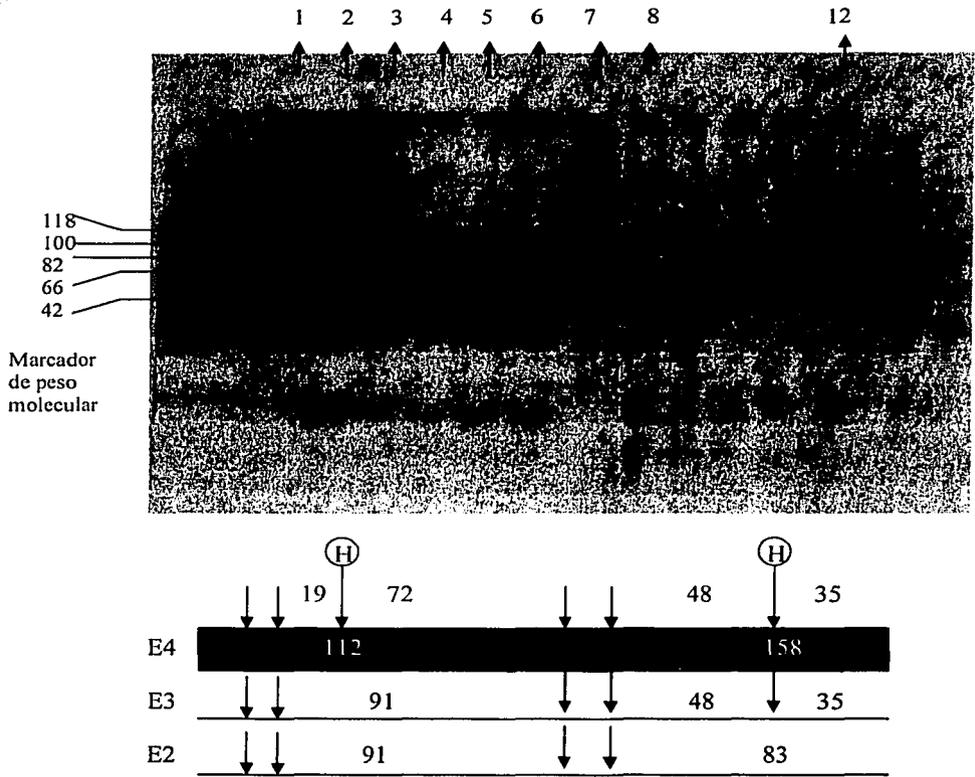


Figura 6 . En la parte superior se muestra un gel de poliacrilamida al 10% teñido en nitrato de plata. Se observan los fragmentos amplificados de DNA y cortados con la enzima *HhaI*. El carril 1 y 7 corresponden al marcador de peso molecular (ϕ iX 174 DNA), carril 2: (apo E-3/3), carril 3: (apo E-4/4), carril 4: (apo E-2/3), carril 5: (apo E-2/4), carril 6: (apo E-4/3), carriles 8 al 12 corresponden al amplificado de las muestras (244pb). En la figura inferior, las flechas indican los sitios de corte con la enzima *HhaI* y los números corresponden al tamaño de la banda para cada alelo.

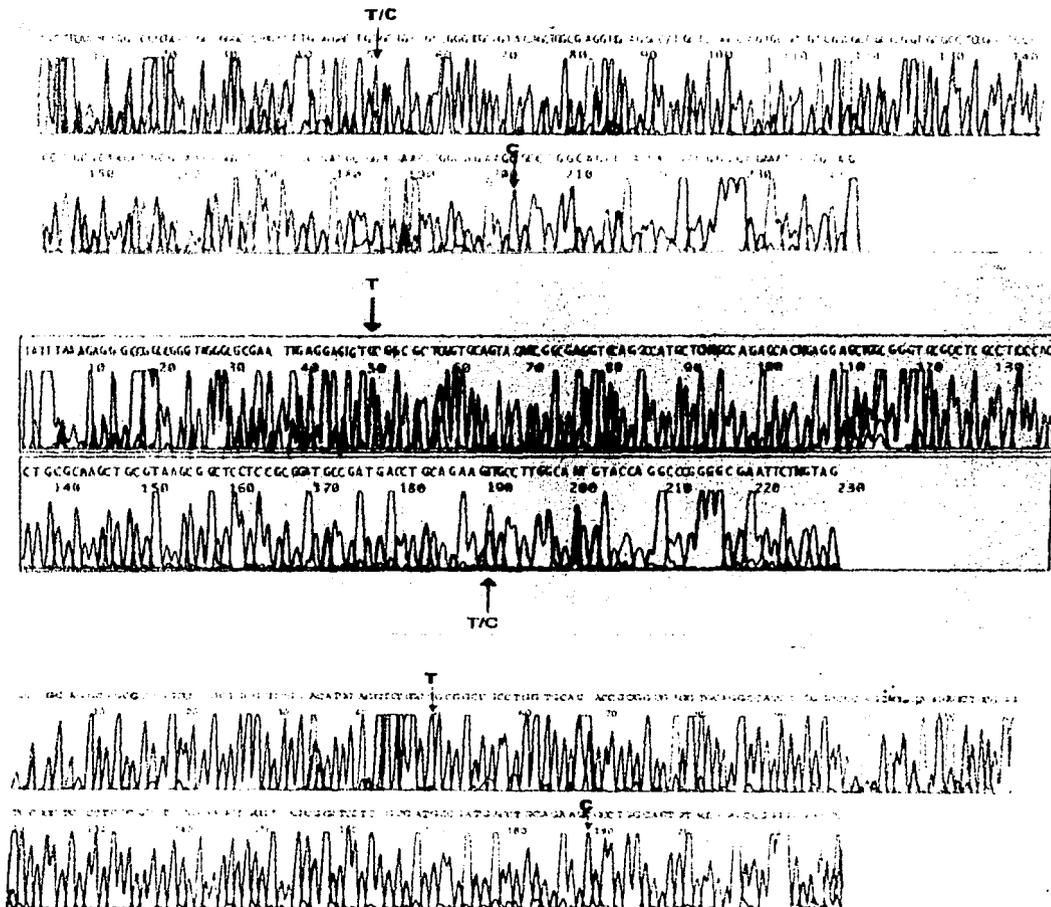


Figura 7: Se muestran tres secuencias para la apoE a través de un secuenciador automático. La parte inferior muestra a un individuo con genotipo E3/3 en la cual se observa un pico en la posición 112 que corresponde a "T" y un solo pico en la posición 158 que corresponde a "C", es decir la combinación T/C del alelo E3 en estado homocigoto. La parte media muestra la secuencia de un individuo con genotipo 2/3 en el cual se observa un solo pico en la posición 112 correspondiente a T y dos picos en la posición 158 que corresponden a T y a C. De tal forma que la combinación T/T corresponde al alelo 2 y la combinación de T/C corresponde al alelo 3. La parte superior muestra la secuencia de un individuo 3/4 con un doble pico en la posición 112 que corresponde a T y C con un solo pico en la posición 158 lo que corresponde a C. Por lo que la combinación T/C es equivalente al alelo 3 y la combinación C/C al alelo 4

RESULTADOS

CÁPITULO I

DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS EN LA POBLACIÓN DE MAZATECOS Y MESTIZOS MEXICANOS.

El estudio se inició con la obtención de las frecuencias tanto alélicas como genotípicas de la población Mestizo Mexicana así como de un grupo indígena Mexicano (Mazatecos), para conocer la distribución de estos alelos, como se observa en la Tabla 4. En ambas muestras la frecuencia observada y la frecuencia esperada se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Solo se detectaron dos alelos en ambas muestras (Tabla 4). Las frecuencias de los alelos de *APOE* en los Mazatecos y los Mestizos Mexicanos muestran diferencias importantes cuando se comparan con otras poblaciones previamente reportadas Sin embargo, cuando se compararon entre ambas poblaciones, no se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas ni en otras poblaciones indígenas como son los Mayas y Yanomami (Tabla 5) ^{68,86}.

Los Mazatecos y los Mestizos mexicanos junto con los Mayas y los México-Americanos ^{68,96}, son poblaciones con las frecuencias más altas del alelo *APOE*3* (>90%). El análisis estadístico mostró un incremento en las frecuencias de este alelo en ambas poblaciones de Mazatecos y Mestizos Mexicanos cuando se compararon con poblaciones de Cayapas, Nuuk, Ammassalik y Caucásicos ^{78,80,86}.

Tabla 4. Distribución de las Frecuencias Alélicas (fa) y Genotípicas (fg) en las Poblaciones de Mazatecos y Mestizos Mexicanos.

Alelo	Mazatecos (n=75)		Mestizos Mexicanos (n=83)	
	n	fa	n	fa
E2	0	0.000	0	0.000
E3	135	0.900	152	0.915
E4	15	0.100	14	0.084
Genotipo	n	fg	n	fg
E3/3	61	0.813	69	0.831
E4/3	13	0.173	14	0.168
E4/4	1	0.013	0	0.000

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron calculadas por conteo directo. Además el equilibrio de Hardy-Weinberg fue determinado utilizando el programa ARLEQUIN

Por otro lado, el alelo *APOE*4* mostró un decremento en la frecuencia en los Mestizos Mexicanos y en el grupo de indígenas Mazatecos cuando se compararon con las poblaciones indígenas de los Cayapas y Ammassalik ($p < 0.05$) (Tabla 5).

La baja frecuencia del alelo *APOE*4* junto con la ausencia del alelo *APOE*2* en las poblaciones Amerindias reportadas, puede ser parte de la genética que le confiere protección a estas poblaciones contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares; debido a que diversos reportes han relacionado al alelo *E4* con una mayor susceptibilidad al desarrollo de enfermedades cardiovasculares⁴²⁻⁵⁵, así, el hecho de tener una baja frecuencia de este alelo

disminuye el riesgo de susceptibilidad a este tipo de enfermedades. Por otro lado, el presentar una baja frecuencia del alelo *E2* o en el caso de los indígenas Amerindios quienes no presentan este alelo, puede conferir una protección contra la hiperlipidemia, la cual se ha asociado con este alelo ³⁶. Estos datos indican que es de vital importancia realizar estudios en los cuales se correlacionen los niveles de lípidos con el polimorfismo genético de la apolipoproteína E en estas poblaciones con el fin de establecer con mayor claridad si existe una relación entre la apo E y la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Para determinar si el genotipo de la apo E tiene un impacto sobre el perfil lipídico, como se ha propuesto para otras poblaciones, nos propusimos estudiar los niveles de lípidos en la población Mexicana y relacionarlos con el polimorfismo genético de la apo E.

CÁPITULO II

POLIMORFISMO DE LA APO-E Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE LÍPIDOS EN LA POBLACIÓN DE LA CIUDAD DE MÉXICO

En la segunda parte del estudio, un total de 278 individuos (200 mujeres y 78 hombres) habitantes de la Ciudad de México, tomados al azar, fueron analizados. Los datos clínicos de esta población de estudio se muestran en la tabla 6. El promedio de edad en hombres fue de 39.8 ± 10.4 años y de mujeres de 40.2 ± 9.4 , el índice de masa corporal fue de 26.8 ± 4.0 kg/m² en los hombres y de 25.9 ± 4.0 kg/m² en las mujeres. Los valores de presión arterial sistólica y diastólica, la relación de cintura-cadera, C-LDL, C-VLDL y triacilgliceroles fueron significativamente mayores en los hombres que en las mujeres ($p < 0.05$) (Tabla 6). Los niveles de C-HDL fueron significativamente menores en hombres que en mujeres ($p < 0.05$), mientras que los niveles de glucosa no presentaron diferencias significativas entre ambos sexos. Del total de la población de estudio, el 17% presentaron hipertensión arterial, 4.3% presentaron diabetes y 1.1% tuvieron infarto al miocardio.

Tabla 5. Frecuencias Alélicas de la Apo-E en Diferentes Poblaciones

Incluyendo a los Mazatecos y los Mestizos Mexicanos.

Población	n	Frecuencias Alélicas			Referencia
		E2	E3	E4	
Mazatecos (México)	75	0.0	0.900*	0.100**	Nuestro estudio ⁸⁸
Mestizos (México)	83	0.0	0.915*	0.084**	Nuestro estudio ⁸⁸
Mayas (México)	135	0.0	0.911	0.089	Kamboh,1991 ⁶⁸
México-Americanos (USA)	210	0.023	0.904	0.071	Haffner,1996 ⁸⁷
Caucásicos (USA)	117	0.140	0.740	0.120	Breslow,1982 ⁹³
Yanomami (Brasil)	96	0.0	0.843	0.156	Crews,1993 ⁸⁶
Cayapa (Ecuador)	91	0.0	0.720	0.280	Scacchi,1997 ⁷⁸
Nuuk (Groenlandia)	100	0.025	0.790	0.185	Gerdes,1996 ⁸⁰
Ammassalik (Groenlandia)	78	0.0	0.769	0.231	Gerdes,1996 ⁸⁰

La distribución de las frecuencias alélicas obtenidas en nuestras poblaciones (Indígenas Mazatecos y Mestizos Mexicanos) fueron comparadas otras poblaciones previamente descritas (Caucásicos⁹³, Indígenas Amerindios^{78,86} y poblaciones de Groenlandia⁸⁰) utilizando la prueba de chi-cuadrada y el valor de p fue corregido por el número de comparaciones (pC).

* Incremento en la frecuencia cuando se comparó con las poblaciones de: Cayapa, Nuuk, Ammassalik y Caucásicos (pC<0.05).

** Decremento en la frecuencia cuando se comparó con las poblaciones de Cayapa y Ammassalik (pC<0.05).

Tabla 6. Parámetros Clínicos y de Laboratorio de los Sujetos de Estudio de la Ciudad de México

	Población Total	Hombres	Mujeres	p
	n=278	n= 78	n=200	
Edad (años)	40.1±9.64	39.8±10.4	40.2±9.4	ns
IMC (Kg/cm ²)	26.2±4.04	26.8±4.0	25.9±4.0	ns
R c/c (cm)	85.7±11.6	93.8±11.4	82.4±9.9	<0.05
TAS (mmHg)	113.9±13.3	120±10.9	111.6±13.5	<0.05
TAD (mmHg)	76.6±9.5	80.3±8.0	75.2±9.6	<0.05
CT (mg/dL)	184.7±36.3	190.2±41.3	182.6±34.0	ns
C-LDL (mg/dL)	121.9±30.6	127±33.5	119±29.2	<0.05
TG (mg/dL)	118.2±72.5	143±87.7	108±63.3	<0.05
C-VLDL (mg/dL)	18.9±11.6	22.9±14.0	17.3±10.1	<0.05
C-HDL (mg/dL)	44.02±12.22	39.5±10.6	45.8±12.4	<0.05
Glucosa (mg/dL)	90.0±31.5	93.1±19.7	88.8±35.05	ns

Prueba t de student. IMC: Índice de masa corporal; R c/c: Relación cintura-cadera; TAS: Presión arterial sistólica; TAD: Presión arterial diastólica; CT: Colesterol total; C-LDL: Colesterol-lipoproteína de baja densidad; TG: Triacilgliceroles; C-VLDL-: Colesterol-lipoproteína de muy baja densidad; C-HDL: Colesterol-lipoproteína de alta densidad.

p<0.05 entre hombres y mujeres

Las frecuencias de los alelos de *APOE*3* observadas en nuestro grupo de estudio fueron comparadas con las frecuencias reportadas en otras poblaciones (Tabla 5). Las frecuencias para *APOE*2*, *APOE*3* y *APOE*4* fueron 3.2%, 89.3% y 7.3% respectivamente. No encontramos diferencias en las frecuencias entre los hombres y las mujeres. En todas las poblaciones el alelo más común fue el *APOE*3*, al igual que en nuestra población de habitantes de la ciudad de México. Es importante mencionar que la frecuencia del alelo E3 en las poblaciones Mexicanas es la más alta para este alelo en la literatura. En esta población de habitantes de la ciudad de México, encontramos una frecuencia de *APOE*2* del 3.2%. Dicha frecuencia es baja comparada con lo observado en otras poblaciones Caucásicas pero alta considerando que fue ausente en la población previamente analizada en este trabajo. Finalmente, la frecuencia de *APOE*4* es de las más bajas reportadas hasta el momento en la literatura, solo comparable con la frecuencia que presenta este alelo en poblaciones asiáticas.

Tabla 7. Frecuencias Alélicas (fa) y Genotípicas (fg) de la Apo-E en la Población de la Ciudad de México.

Alelo	n	fa
E2	18	0.032
E3	497	0.893
E4	41	0.073
Genotipo		fg
E2/3	14	0.050
E2/4	4	0.014
E3/3	224	0.805
E3/4	35	0.125
E4/4	1	0.003

El impacto del genotipo de la apo E sobre el perfil de lípidos en el grupo total de individuos estudiados se muestra en la Tabla 8. Los datos fueron ajustados por edad e índice de masa corporal (IMC). No se encontraron diferencias significativas en la población total estudiada de habitantes de la ciudad de México en los niveles de lípidos entre los genotipos *E2/3* y *E3/4* cuando se compararon con el genotipo *E3/3*. Por lo cual se decidió, realizar el análisis separadamente entre hombres y mujeres, pero debido al bajo número de hombres que presentaron un genotipo diferente al *E3/3*, el análisis se muestra únicamente en mujeres (Tabla 8). En este caso, se observó incremento en las concentraciones de C-HDL en las mujeres con genotipo *E2/3* cuando se compararon con las mujeres portadoras del genotipo *E3/3* y *E3/4*. Por otro lado, las mujeres portadoras del genotipo *E3/4* presentaron valores significativamente mayores de C-LDL y de colesterol total con respecto a las mujeres con el genotipo *E3/3*.

Se conoce que otros factores además de los genéticos, pueden modificar la influencia del polimorfismo de la apo E sobre los niveles de lípidos, por lo tanto, para descartar el efecto de la obesidad tomando en cuenta el IMC, analizamos al grupo total de individuos estudiados y dividido por genotipo, considerando solo aquellos sujetos cuyos índice de masa corporal oscilara entre los 20-25 Kg/m². En la Tabla 9, se muestra que los sujetos portadores del genotipo *E3/4* presentaron los niveles más elevados de colesterol total, C-LDL, C-VLDL y los triacilgliceroles, mientras que los sujetos portadores del genotipo *E2/3*, presentaron los niveles más elevados de C-HDL y los más bajos para los otros parámetros. En esta tabla se observa la misma tendencia en los niveles de lípidos de acuerdo al genotipo encontrado en otras poblaciones, sin embargo, ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

Tabla 8. Perfil de Lípidos de Acuerdo al Genotipo

	POBLACION TOTAL ^Ω			MUJERES		
	E2/3	E3/3	E3/4	E2/3	E3/3	E3/4
n=	14	224	36	11	158	26
CT (mg/dL)	197.05±8.9	183.6±2.3	187.4±5.7	196.3±29.0	179.4±33.4**	1197.5±35.4
C-LDL (mg/dL)	126.6±7.5	121.1±1.9	126.3±4.8	124.0±31.4	117.0±28.0*	134.0±31.7
TG (mg/dL)	132.3±18.2	117.7±4.6	110.8±11.7	117.1±51.4	108.5±67.5	108.0±44.8
C-HDL (mg/dL)	49.4±3.1	43.9±0.8	43.4±1.99	53.7±19.5	45.2±12.0*	46.2±11.0

ANCOVA ^Ω ajustados por IMC y edad. CT: Colesterol Total; C-LDL; Colesterol-lipoproteína de baja densidad; TG: Triacilgliceroles; C-HDL: Colesterol-lipoproteína de alta densidad.

*p <0.05 vs E3/4 en C-LDL y vs E2/3 en C-HDL

**p <0.01 vs E3/4 .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9. Niveles de Lípidos (promedio±DS.) por Genotipo en Individuos con IMC entre 20-25.

	APOE-2/3	APOE-3/3	APO-E3/4
n=	6	89	10
CT (mg/dL)	172.40 ± 12.16	177.09 ± 3.16	179.96 ± 9.46
C-LDL (mg/dL)	101.18 ± 8.95	113.99 ± 2.32	118.61 ± 6.96
TG (mg/dL)	81.73 ± 30.65	97.51 ± 7.95	110.15 ± 23.85
C-VLDL (mg/dL)	13.08 ± 4.91	15.60 ± 1.27	17.62 ± 3.82
C-HDL (mg/dL)	58.15 ± 5.71	47.70 ± 1.48	43.82 ± 4.44

ANCOVA ajustada por IMC, sexo y edad. CT: Colesterol Total; C-LDL: Colesterol Lipoproteína de Baja Densidad; TG: Triacilgliceroles; C-VLDL: Colesterol-Lipoproteína de Muy Baja Densidad; C-HDL: Colesterol-Lipoproteína de Alta Densidad.

CAPITULO III

APO E Y PERFIL LIPÍDICO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA

Debido a que el polimorfismo de la apo E se ha relacionado fuertemente con enfermedades cardiovasculares y de manera importante con la susceptibilidad a la aterosclerosis, se decidió estudiar una población de pacientes con enfermedad arterial coronaria diagnosticada.

Se estudiaron un total de 197 pacientes (46 mujeres y 151 hombres). En la Tabla 10 se muestran los datos clínicos de los pacientes estudiados. La edad media fue de 55.6 ± 9.9 en la población total, (57.5 ± 10.2 en mujeres y 55.1 ± 9.8 en hombres) mientras que el índice de masa corporal fue de 27.4 ± 4.4 . Los niveles de colesterol total y C-HDL se encontraron más altos en las mujeres con respecto a los hombres, pero solo el C-HDL presentó una diferencia significativa al compararse con los hombres (41.2 ± 12.3 en mujeres y 35.6 ± 9.2 en hombres $p < 0.05$). Los valores de triacilgliceroles se encontraron bajos en las mujeres (185.8 ± 82.5) en comparación a los hombres (208.9 ± 125.3) sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Cuando se agruparon los pacientes con EAC de acuerdo al genotipo de apo E (Tabla 11), se encontró que los individuos con el genotipo $E3/4$, presentaron incremento en los niveles de colesterol total, C-LDL y triacilgliceroles y una disminución en los niveles de C-HDL, al compararse con los individuos portadores de los genotipos $E3/3$ y $E2/3$. Sin embargo, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de C-HDL en los genotipos $E3/4$ y $E3/3$ vs $E2/3$ ($p < 0.05$).

Es importante mencionar que no se encontró ningún individuo homocigoto para el alelo *APOE*2*, y solo un individuo homocigoto para el alelo *APOE*4*. Estos datos corroboran lo encontrado en la población mestiza y habitantes de la ciudad de México, reportado previamente en este trabajo.

Tabla 10. Parámetros Clínicos y de Laboratorio de los Sujetos de Estudio con EAC

	Total N=197	Mujeres N=46	Hombres N=151	p
Edad (años)	55.65±9.94	57.51±10.27	55.14±9.83	ns
IMC (Kg/m ²)	27.48±4.45	26.93±4.64	27.62±4.40	ns
CT (mg/dL)	195.05±39.54	198.61±46.42	193.95±37.31	ns
C-LDL (mg/dL)	126.60±40.41	126.09±48.26	126.76±37.87	ns
TG (mg/dL)	203.56±117.77	185.87±82.58	208.95±126.31	ns
C-HDL (mg/dL)	36.97±10.33	41.26±12.39	35.66±9.27	<0.05

IMC: Índice de Masa Corporal; CT: Colesterol Total; C-LDL: Colesterol-lipoproteína de baja densidad; TG: Triacilglicérols; C-HDL: Colesterol-lipoproteína de alta densidad.

p <0.05 Prueba t de student (hombres vs mujeres)

Finalmente para corroborar el grado de mestizaje de esta población estudiada se calcularon las frecuencias tanto alélicas como genotípicas de la APOE para el grupo total y dividida por sexo.

Como se muestra en la Tabla 12, al igual que en las poblaciones que previamente hemos descrito en este trabajo, el alelo *APOE*3* (90.6%) y el genotipo *E3/3* (81.2%) fueron los más frecuentes. Mientras que las frecuencias más bajas fueron para el alelo *APOE*4* (8.1%) y para *APOE*2* (1.2%). Las frecuencias tanto alélicas como genotípicas en ambos sexos fueron iguales. Debido a que solo se encontró un individuo con el genotipo *E4/4*, no se tomó en cuenta para el análisis estadístico.

Tabla 11. Perfil de Lípidos de la Población Total de Estudio con EAC de Acuerdo al Genotipo.

	APOE3/2 n=5	APOE3/3 n=160	APOE3/4 n=32	p
CT (mg/dL)	193.80±39.40	193.64±39.77	202.22±38.89	ns
C-LDL (mg/dL)	122.80±33.78	125.08±36.57	134.78±56.81	ns
TG (mg/dL)	141.20±82.74	201.09±120.09	225.66±107.55	ns
C-HDL (mg/dL)	48.80±14.31	36.53±10.30	37.34±8.96	<0.05

CT: Colesterol Total; C-LDL: Colesterol-lipoproteína de baja densidad; TG: Triacilglicerol; C-HDL: Colesterol-lipoproteína de alta densidad.

p<0.05 apo E3/2 vs apo E3/4

Tabla 12. Distribución de las Frecuencias Alélicas (fa) y Genotípicas (fg) de la APO-E en la Población Mexicana con Enfermedad Cardiovascular.

Alelo	TOTAL		MUJERES		HOMBRES	
	n	fa	n	fa	n	fa
E2	5	(0.012)	1	(0.01)	4	(0.013)
E3	357	(0.906)	84	(0.913)	273	(0.903)
E4	32	(0.081)	7	(0.07)	25	(0.08)
Genotipo	n	fg	n	fg	n	fg
E3/2	5	(0.025)	1	(0.021)	4	(0.025)
E3/3	160	(0.812)	38	(0.826)	122	(0.807)
E3/4	32	(0.162)	7	(0.152)	25	(0.165)

DISCUSION Y CONCLUSION.

I. POLIMORFISMO DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN LA POBLACIÓN MESTIZA E INDÍGENA DE MÉXICO:

En la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones estudiadas inicialmente (Mestizos y Mazatecos Mexicanos) solo se detectó la presencia de dos alelos, *APOE*3* y *APOE*4* en ambas poblaciones (Tabla 4). El genotipo *E3/3* fue el más frecuente tanto en los Mestizos (0.831) como en los Mazatecos (0.813). Así, las dos poblaciones presentaron frecuencias muy similares excepto en el genotipo *E4/4* el cual fue ausente para la población de Mestizos Mexicanos.

Este reporte preliminar nos permite conocer la relación entre las poblaciones indígenas y la población Mestiza Mexicana. Para conocer la distribución de las frecuencias de estos alelos en otras poblaciones y su relación con los otros grupos Mexicanos se realizó la comparación con datos de frecuencia reportados en poblaciones Caucásicas, Amerindias y Orientales (Tabla 5).

Las frecuencias de los alelos de la apo E en la población Mestiza y Mazateca mostraron diferencias importantes al realizar esta comparación. En el caso del alelo *E2*, este se encontró ausente en las poblaciones Mexicanas estudiadas así como en otras poblaciones indígenas previamente reportadas: Mayas (México), Yanomami (Brasil) y Cayapas, (Ecuador). Se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon los Mestizos Mexicanos y los indígenas Mazatecos con las poblaciones Caucásicas (Tabla 5).

Estos datos nos muestran que las poblaciones Amerindias presentan una carga genética distinta a las poblaciones Caucásicas y que probablemente la presencia del alelo *E2* en

algunas poblaciones pueda deberse a un grado de mestizaje con estas poblaciones, como el que se observa en los México-Americanos.

En 1984, el Dr Craing Hanis definió algunos desordenes metabólicos en una población de México-Americanos, el cual describió como el síndrome del nuevo mundo⁹¹. Este síndrome incluye la obesidad central, la diabetes mellitus, desórdenes en el metabolismo de los ácidos biliares y carcinoma en la vesícula biliar. El riesgo para desarrollar el síndrome de "el nuevo mundo" parece estar directamente relacionado con una alta carga genética Amerindia. En el caso de las enfermedades cardiovasculares al parecer sucede lo contrario, ya que el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular incluyendo la aterosclerosis, es baja en los México-Americanos, a pesar de que tanto nuestros datos así como otros reportes muestran concentraciones de triacilglicérols ligeramente mayores con respecto a la población Caucásica⁹⁶. Estos datos han llevado a algunos investigadores a postular que los México-Americanos pueden estar relativamente protegidos contra el desarrollo de algunas enfermedades cardiovasculares por su genética. Parece existir una relación importante entre el polimorfismo de la apolipoproteína E y los niveles de lípidos, sugiriendo que este gen puede ser parte de esa genética que le confieren protección a la población Mexicana.

Nuestros datos, los cuales son similares a los descritos para la población de Mexico-Americanos⁸⁷ están de acuerdo con esta hipótesis. Cuando se compararon con las poblaciones Caucásicas, los indígenas Mexicanos y los Mestizos mostraron una disminución en la frecuencia de *APOE*2* y *APOE*4*, dos variantes que han sido asociadas con aterosclerosis e hiperlipidemia, y consecuentemente con el riesgo de desarrollar enfermedad arterial coronaria (EAC) en poblaciones caucásicas^{92,93}. La frecuencia de *APOE*4* en la población Mexicana, se encuentra entre las más bajas a nivel mundial,

seguida solo de la población Asiática ⁸⁵. Esta frecuencia puede estar correlacionada con la baja frecuencia de enfermedades cardiovasculares en esta población comparada con las poblaciones Europeas³⁸. Los Chinos y los Japoneses, dos poblaciones con los valores más bajos de EAC, también muestran las frecuencias más bajas de *APOE*4*³⁸. Contrariamente, los Finlandeses, presentan la frecuencia más alta de este alelo, llevando a la especulación de que el alelo *APOE*4* contribuye a aumentar la prevalencia de EAC en esta población ³⁷. Este alelo es también frecuente en otras poblaciones como son los Africanos y aborígenes de Oceanía; sin embargo la prevalencia de EAC en estas poblaciones es desconocida. Nuestros datos están de acuerdo con reportes previos ⁸⁶ que muestran la ausencia del alelo *APOE*2* en grupos Americanos Indígenas, lo cual sugiere que *APOE*2* estaba ausente en los habitantes del noreste de Asia quienes cruzaron el Ártico y poblaron el continente Americano⁹¹. Estos datos preliminares hacen importante el estudio de los niveles de lípidos en estas poblaciones y su correlación con el polimorfismo genético de la apolipoproteína E.

II. POLIMORFISMO DE LA APOLIPOPROTEÍNA E Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE LÍPIDOS:

Genética de Poblaciones: Para poder establecer la relación que existe entre el polimorfismo genético de la apo E con los niveles de lípidos, se realizó el estudio con 278 individuos tomados al azar habitantes de la ciudad de México. Con el fin de poder establecer las diferencias genéticas encontradas en la primera fase de nuestro estudio, se realizó la caracterización tanto alélica como genotípica de la apo E en cada individuo y se comparó con los datos previamente mencionados.

Las frecuencias alélicas encontradas en esta fase experimental fueron muy similares a las mencionadas para los grupos de Mestizos Mexicanos y de indígenas Mazatecos, sin embargo, nuevamente se muestran diferencias importantes al comparar estos grupos con otras poblaciones, principalmente con los de origen Caucásico^{82,85} (Tabla 7).

El porcentaje encontrado para el alelo *E2* (3.2%) en los sujetos estudiados de la ciudad de México, puede deberse a la mezcla con las poblaciones Caucásicas, quienes muestran una frecuencia relativamente alta de este alelo (14%)⁴⁰. Además en esta población fue muy semejante a la reportada anteriormente (Mestizos Mexicanos) con una alta frecuencia del alelo *APO*E3* (89.3%) e igualmente una de las frecuencias más bajas reportadas para *APO*E4* (7.3%) en comparación con otras poblaciones, principalmente de origen Caucásico.

Polimorfismo de la APOE y los niveles de lípidos. Diversos reportes han mostrado la relación entre el genotipo de la apo E y los niveles de lípidos en diferentes poblaciones, principalmente en los Caucásicos. Tanto los individuos hombres como las mujeres

II. POLIMORFISMO DE LA APOLIPOPROTEÍNA E Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES DE LÍPIDOS:

Genética de Poblaciones: Para poder establecer la relación que existe entre el polimorfismo genético de la apo E con los niveles de lípidos, se realizó el estudio con 278 individuos tomados al azar habitantes de la ciudad de México. Con el fin de poder establecer las diferencias genéticas encontradas en la primera fase de nuestro estudio, se realizó la caracterización tanto alélica como genotípica de la apo E en cada individuo y se comparó con los datos previamente mencionados.

Las frecuencias alélicas encontradas en esta fase experimental fueron muy similares a las mencionadas para los grupos de Mestizos Mexicanos y de indígenas Mazatecos, sin embargo, nuevamente se muestran diferencias importantes al comparar estos grupos con otras poblaciones, principalmente con los de origen Caucásico^{82,85} (Tabla 7).

El porcentaje encontrado para el alelo *E2* (3.2%) en los sujetos estudiados de la ciudad de México, puede deberse a la mezcla con las poblaciones Caucásicas, quienes muestran una frecuencia relativamente alta de este alelo (14%)⁴⁰. Además en esta población fue muy semejante a la reportada anteriormente (Mestizos Mexicanos) con una alta frecuencia del alelo *APO*E3* (89.3%) e igualmente una de las frecuencias más bajas reportadas para *APO*E4* (7.3%) en comparación con otras poblaciones, principalmente de origen Caucásico.

Polimorfismo de la APOE y los niveles de lípidos. Diversos reportes han mostrado la relación entre el genotipo de la apo E y los niveles de lípidos en diferentes poblaciones, principalmente en los Caucásicos. Tanto los individuos hombres como las mujeres

portadores del alelo *APO*E4* tienden a presentar niveles altos de colesterol total ^{96,97}, C-LDL y triacilgliceroles ⁷⁸, mientras que los individuos portadores del alelo *APO*E2* presentan los niveles opuestos a los de *APO*E4*, esto es, una disminución en los niveles de C-LDL y colesterol total y un aumento en los niveles de C-HDL ⁹⁸. En nuestra población de estudio, encontramos incremento en los niveles de colesterol LDL y colesterol total en las mujeres portadoras del genotipo *E3/4*. Mientras que en el grupo total de estudio, pero únicamente en los individuos con un índice de masa corporal entre 20 y 25 Kg/m² se observa la misma tendencia en los niveles de lípidos de acuerdo al genotipo encontrado en otras poblaciones, sin embargo, ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa, debido muy probablemente al escaso número de individuos encontrados con un genotipo diferente a *E3/3*. Lo anterior sugiere que otros factores como es la obesidad pueden alterar los niveles de los lípidos.

Varios reportes sugieren que el efecto del polimorfismo de la apo E sobre las concentraciones de C-LDL puede ser mediado por el receptor de LDL ⁹⁹. Esto esta de acuerdo con el hecho de que los individuos portadores del alelo *APOE*2* presentan baja afinidad de unión con su receptor y esto se ha asociado con la baja de colesterol del hepatocito y la sobre regulación del receptor de LDL, el cual provoca una remoción plasmática de LDL y en consecuencia, una disminución de colesterol LDL plasmático ⁹⁸. Por otro lado, el alelo *E4*, muestra los efectos metabólicos opuestos al alelo *E2*, esta isoforma presenta gran afinidad para las lipoproteínas ricas en triacilgliceroles e induce una rápida captura del hígado. Como consecuencia, hay un incremento en los niveles de colesterol LDL en el plasma.

Con respecto a la relación entre el alelo *E2* y el C-HDL los resultados encontrados en la literatura son controversiales. Mientras que diversos investigadores no han podido

encontrar una asociación entre el alelo *APOE**2 y los niveles bajos de C-HDL^{100,101}, otros han reportado un incremento en los sujetos portadores del alelo *APOE**2¹⁰². Dos estudios previos^{103,104} detectaron una asociación únicamente en mujeres portadoras del alelo *E2* con niveles altos, mientras que las portadoras del alelo *E4* mostraron niveles bajos de colesterol HDL al compararse con las mujeres portadoras del genotipo *E3/3*. En nuestra población estudiada para los habitantes de la ciudad de México, el efecto del polimorfismo de la apo E y niveles de colesterol HDL solo se observó en las mujeres, en el caso de los hombres este análisis no se realizó debido al bajo número de individuos portadores de los genotipos *E2/3* y *E3/4*. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar la relación entre el polimorfismo de la apo E y los niveles de colesterol HDL pero esta relación no ha sido aclarada. Recientemente se sugirió que la apo E jugaba un papel muy importante en la regulación de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), la cual tiene un efecto directo sobre las concentraciones de colesterol HDL¹⁰⁵. Otra explicación puede ser la participación de la apo E en el eflujo extracelular de colesterol⁸⁷, el cual varía dependiendo del genotipo de la apo E.

El genotipo de la apo E se asocia con niveles altos de C-HDL, mientras que los individuos portadores del genotipo *E3/4* presentan niveles altos de C-LDL y colesterol total. Nosotros este efecto solo lo observamos en la población femenina. Estos datos sugieren la realización de otros estudios con un mayor número de individuos para tratar de correlacionar el polimorfismo de la apo E con el perfil de lípidos que pueda ayudar a establecer una verdadera relación de este polimorfismo en la población Mexicana.

III. POLIMORFISMO DE LA APO-E Y LA SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE ATEROSCLEROSIS

Debido a que los factores de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis aún no están bien definidos, se han realizado diversos estudios para tratar de encontrar nuevos factores que puedan contribuir al desarrollo de la enfermedad. El estudio de las apolipoproteínas y en particular la apolipoproteína E ha sido uno de los blancos de interés. Se conoce que la apo E modula el transporte y metabolismo de las lipoproteínas y su polimorfismo puede explicar el 7% de la variación de colesterol a nivel poblacional¹⁰⁶. Algunos reportes mencionan un fuerte impacto del polimorfismo de la apo E sobre la EAC, en donde el riesgo para la enfermedad se ha asociado fuertemente con la presencia del alelo *E4* (*apo E2/4*, *3/4* y *4/4*)⁴⁶ de manera indistinta en hombres y mujeres. Al analizar los niveles de lípidos en la población total (Tabla 10) encontramos un incremento de alto riesgo en los niveles de triacilgliceroles (203.56 ± 117.77) el cual fue mayor en los hombres (208.95 ± 126.31). Así mismo, encontramos los valores de IMC con sobrepeso. Al comparar el perfil de lípidos entre hombres y mujeres no encontramos diferencias entre ambos excepto en los niveles de C-HDL, donde las mujeres presentaron, un valor mas alto ($p < 0.05$).

Se conoce que las lipoproteínas asociadas a los triacilgliceroles tienen un efecto aterogénico que puede ser contrarrestado por los niveles elevados de C-HDL. En los sujetos estudiados con EAC presentaron valores medios por arriba de 35 mg/dl. Sin embargo, hay que considerar que en ambos sexos el promedio de C-HDL fue mayor a 35 mg/dl.

Se conoce que los sujetos que presentan niveles altos de HDL tienen menor riesgo de enfermedad cardiovascular y se ha reportado este aumento en los niveles de colesterol HDL principalmente en los individuos portadores del alelo *E2* e inversamente, una disminución de los niveles de HDL en los individuos portadores del alelo *E4*. Por otro lado, en un meta-análisis llevado a cabo por Dallongeville y colaboradores, mostraron que los sujetos con los alelos *E2* y *E4* presentaban niveles de triacilglicérols mayores a los sujetos portadores del alelo *E3*⁴⁷. Esta relación está bien establecida como un factor de riesgo para la aterosclerosis y las variaciones en el locus del gen pueden ser entonces, determinantes en el riesgo de EAC en la población.

Al analizar los niveles de lípidos de acuerdo al genotipo, encontramos gradiente en el incremento de CT, C-LDL y triacilglicérols de acuerdo al genotipo; esto es, mayor en *E3/4*, intermedio en *E3/3* y menor en *E3/2* y de forma inversa en los niveles de C-HDL, esto es, mayor en *E3/2*, intermedio en *E3/3* y menor en *E3/4*. Este perfil de lípidos está de acuerdo a lo reportado en otras poblaciones, sin embargo solo se observó una diferencia significativa en el colesterol HDL en los individuos portadores del genotipo *E3/2* al compararse con los individuos portadores del genotipo *E3/3* y *E3/4* ($p < 0.05$).

Estas diferencias están de acuerdo con otros reportes en donde se ha asociado el alelo *E2* con niveles altos de C-HDL lo cual puede ser un factor protector contra el desarrollo de aterosclerosis y contrarrestar el efecto maligno que pudieran causar los niveles elevados de CT, C-LDL y triacilglicérols.

Hay que considerar que el número de individuos con enfermedad cardiovascular analizados portadores del alelo diferente a *E3* fue muy bajo. El porcentaje de individuos portadores del alelo *E4* fue del 8.1% ($n=32$), mientras que el porcentaje de individuos con el alelo *E2* fue apenas del 1.2% ($n=5$). Estas bajas frecuencias hacen difícil poder establecer una fuerte

relación entre el genotipo de la *apo E* con los niveles de lípidos y la enfermedad arterial coronaria, como se ha realizado en otras poblaciones principalmente de origen Caucásico en donde la frecuencia de los alelos *E2* y *E4* es mayor (12-15%).

En cuanto a la distribución de las frecuencias tanto alélicas como genotípicas de la *apo E* en los individuos con EAC, se observó una frecuencia muy similar a los habitantes de la ciudad de México. Estos datos corroboran el bajo polimorfismo de la *apo E* en nuestra población.

Finalmente, hay que considerar que la variabilidad entre las asociaciones reportadas y el genotipo de la *apo E* con el riesgo de la aterosclerosis pueden estar afectadas por diferentes factores que pueden alterar la asociación entre el genotipo de la *apo E* y los niveles de lípidos en el plasma. Entre estos pueden estar involucrados factores ambientales, dietéticos, farmacológicos, además de otros genes que participan en la regulación en los niveles de lípidos plasmáticos como son: la lipasa hepática, la lipoproteína lipasa o la proteína transportadora de ésteres de colesterol entre otros.

En conclusión, la distribución de los alelos de la *apo E* en la población mestiza como indígena de México son muy semejantes, la frecuencia del alelo *E2* es de las más bajas reportadas en la literatura y parece ser que esta isoforma no se encuentra presente en las poblaciones indígenas Amerindia, lo cual sugiere que este alelo proviene de las poblaciones Caucásicas. No encontramos una asociación significativa entre el polimorfismo genético de la *apo E* y los niveles de lípidos excepto en las mujeres que presentaron niveles altos de C-HDL en el genotipo *E2/3* vs *E3/3* y de C-LDL y colesterol total en el genotipo *E3/4* vs *E3/3*. Al hacer el análisis con pacientes con EAC solo encontramos un aumento en las C-HDL en las mujeres y en la población total de estudio con el genotipo *E2/3*.

Este trabajo muestra la importancia del estudio de los genes en diferentes poblaciones, pues como aquí se muestra la carga genética que se encuentra en los diferentes grupos étnicos es muy variada y por lo tanto conocer la genética de poblaciones lo hace importante para encontrar estos genes de susceptibilidad y poder utilizarlos como marcadores genéticos de la enfermedad.

Es necesario buscar en nuestra población otros genes de susceptibilidad de la enfermedad, principalmente de aquellos que intervienen en el metabolismo de los lípidos así como los genes potencialmente involucrados en la iniciación de la placa ateromatosa, ya que el polimorfismo de la apo E en nuestra población es muy bajo.

REFERENCIAS

1. MAHALEY RW. *Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science 1988; 240:622-630.
2. SHORE B, SHORE VG. *Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins: Separation of species differing in protein components*. Biochemistry 1973; 12:502-507.
3. SHELburne FA, QUARTFORDT SH. *A new apoprotein of human plasma very low density lipoproteins*. J Biol Chem 1974; 249:1428-1433.
4. MAHALEY RW, INNERARITY TL, WEISGARBER KH. *Alteration in metabolic activity of plasma lipoprotein following selective chemical modification of the apoprotein*. Ann NY Acad Sci 1980; 348:265-277.
5. THUREN T, WEISGRABER TH, SISSON P, WAITE M. *Role of apoprotein E in hepatic lipase catalized hidrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins*. Biochemistry 1992; 31:2332-2338.
6. FIELDING CJ, FIELDING PE. *Molecular physiology of reverse cholesterol transport*. J Lipid Res 1995; 95:611-618.
7. ZORICH N, JONAS A, POWNALL HS. *Activation of lecithin cholesterol aciltransferasa by human apoprotein E in discoidal complex with lipids*. J Biol Chem 1985; 260:8831-8837.
8. BLUM CB: *Dynamics of apolipoprotein E metabolism in humans*. J Lipid Res 1982; 23:1308-1316.
9. HUANG DY, GOEDERT M, JAKES R, WEISGRABER KH, GARNER CC, SAUDERS AM. *Isoform especific interaction of apolipoprotein E with the microtubule associated protein MAP2c: Implication for Alzheimer's disease*. Neurosci Lett 1994; 82:55-58.
10. HUANG DY, VON ECKARDSTEIN A, WU S, ASSMANN G. *Effects of apolipoprotein E polimorphism on intake and transfer of cell-derived cholesterol in plasma*. J Clin Invest 1995; 96:2693-2701.
11. ELSHOURBAGY NA, LIAO, WS, MAHALEY RW, TAYLOR JM. *Apolipoprotein E mRNA in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissue of rats and marmosets*. Proc Natl Acad Sci 1985; 82:203-207.

12. BLUE ML, WILLIAMS DL, ZUCKER S, KHAN SA, BLUM CB. *Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver*. Proc Natl Acad Sci. 1983; 80:283-287.
13. LINTON MF, GISH R, HUBI ST, BUTLER E, ESQIEVEL C, BRI WI et al. *Phenotypes of apolipoprotein B and E after liver transplantation* J Clin Invest. 1991; 88:270-281.
14. UTERMANN G, LENGENBECK U, BEISIEGEL U WEBER W. *Genetic of the apolipoprotein E system in man*. Biochemistry. Am J Hum Gen, 1980, 32(3):39-47.
15. ZANNIS VI, BRESLOW JL. *Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphisms is explained by genetic variation and posttransnational modification*. 1981, 20(4):1033-1041.
16. MAHLEY RW, INNERARITY TL, TALL SC, WEISGRABER KH. *Plasma lipoproteins. Apolipoproteins structure and function*. J Lipid Res 1984; 25:1277.
17. HUI DY, BRECHT WJ, HALL EA, FRIEDMAN G, INNERARITY TL, MAHLEY RW. *Isolation and characterization of apolipoprotein E receptor from canine and human liver*. J. Biol Chem 1986; 261:4256-67.
18. MAHLEY RW, HUI DY, INNERARITY TL, BEISIEGEL U. *Chylomicrons remnants metabolism. Role of hepatic lipoproteins receptor in mediating uptake*. Atherosclerosis 1989, 9 (1) 14-18.
19. WILSON C, WARDELL MR, WEISGRABER KH, MAHLEY RW, AGARD DA. *Three dimensional structure of LDL receptor binding domain of human apolipoprotein E*. Science. 1991, 252:1817-1822.
20. LALAZAR A, MAHLEY RW. *Human apolipoprotein E. Receptor binding activity of truncated variants with carboxyl terminal deletions*. J Biol Chem 1989; 264:8447-8450.
21. LALAZAR A, WEISGRABER KH, RALL SC, GILADI H, INNERARITY TL, LEVANON AZ. *Site specific mutagenesis of human apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants of a single amino acid substitutions*. J Biol Chem 1988, 263:3542-3545.
22. PÉREZ-MENDEZ O, LUC G, POSADAS-ROMERO C. *Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad aetrial coronaria*. Arch Inst Cardiol Mex 2000, 70:312-321.

23. HAVEL RJ, GOLDSTEIN JM, BROWN MS. *In metabolic control and disease*, PK Bondy and LE Rosenberg Eds. (Saunders Philadelphia ed 8, 1980) pp: 393-494.
24. GORDON V, INNERARITY TL MAHLEY RW. *Formation of cholesterol and apoprotein E enriched high density lipoprotein in vitro*. J Mol Chem 1983, 258 (10): 6202-6212.
25. KOO H, INNIRARITY TL, MAHLEY RW. *Obligatory role of cholesterol and apolipoprotein E in the formation of large cholesterol enriched and receptor active high density lipoproteins*. J Biol Chem 1985, 60 (22): 11934-43.
26. MAHLEY RW. *Cellular and molecular biology of lipoprotein metabolism in atherosclerosis* Diabetes 1981,30 (2):60-65.
27. MAHLEY RW. *Atherogenic lipoproteinemia. The cellular and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary fat and cholesterol*. Med Clin North Am 1982. 66(2):375-402.
28. WEISGRABER KH, MAHLEY RW. *Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-Shepharo affinity chromatography*. J Lipid Res 1980. 21(3):316-325.
29. TALL RA, ATKINSON D, SMALL DM, MAHLEY RW. *Characterization of apolipoproteins of atherosclerotic swine* J Mol Chem. 1977, 252 (20):7288-93.
30. IGNATIUS MJ, GEBICKE-HARTER PJ, SKENE H, SCHILLING JW, WEISGRABER KH, MAHLEY RW, SHOOTER JM. *Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration*. Proc Natl Acad Sci. 1986 83(4):1125-1129.
31. SNIPES GJ, McGUIRE CB, NORDEN JJ, FREEMAN, JA. *Nerve injury stimulates of secretion of apolipoprotein E by noneuronal cells*. Proc Natl Acad Sci. 1986, 83(4):1130-1134.
32. BOYLES JK, PITAS RE, WILSON E, MAHLEY RW, TAYLOR JM. *Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and the nonmyelinating glia on the peripheral nervous system*. J Clin Invest. 1985, 76(4):1501-1513.
33. EXP PANEL HIGH BLOOD CHOL ADULTS *Summary of the second report of the National .Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II)*. JAMA 1993; 269:3015-3023.

34. GENEST JJ, MARTIN MUNLEY SS, McNAMARA JR. *Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease*. *Circulation* 1992; 85:2025-2033.
35. MAHLEY RW, INNERARITY TL: *Lipoprotein receptor and cholesterol homeostasis*. *Biochim Biophys Acta* 1983; 737:197-222.
36. MAHLEY RW, ANGELIN B: *Type III hiperlipoproteinemia recent insights into the genetic defect of familial dysbetalipoproteinemia*. *Advance Inter Med* 1984; 29:385-411.
37. SING CF, DAVIGNON J: *Role of apolipoproteins E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation*. *Am J Hum Gen* 1985; 37:268-285.
38. UTERMANN G, HESS M, STEINMETZ: *Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man*. *Nature* 1977; 269:604-607.
39. EHINHOLM C, LUKKA M, KUSS T, NIKKILA E, UTERMANN G: *Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: Genes frequencies and relation to lipoprotein concentrations*. *J lipid Res* 1986; 27:227-235.
40. DAVIGNON J, GREGG RE, SING CF: *Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis*. *Atherosclerosis* 1988; 8:1-20.
41. BOERWINKLEY E, UTERMANN G: *Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B and cholesterol metabolism*. *Am J Hum Genet* 1988; 42:102-122.
42. WILSON PWT, SCHAEFER EJ, LARSON MG, ORDOVAS JM: *Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1250-1255.
43. WILSON RS, SHNEIDER JA, BARNES L, BECKETT LA, AGGARWAL NT, COCHRAN EJ, BACH J, FOX J, EVANS DA, BENNET DA. *The apolipoprotein E ε4 allele and decline in different cognitive systems during a 6-year period*. *Arch Neurol* 2002; 59:1154-1160.
44. DALLONGEVILLE J, TIRET L, VISVIKIS S. *Effect of apo E phenotype on plasma postprandial triglyceride levels in young male adults with and without a familial history of myocardial infarction : the EARS II study*. *European Atherosclerosis research Study*. *Atherosclerosis* 1999; 145:381-388.

45. REILY SL, FERREL RE, KOTTKE BA, KAMBOH MI, SING CF. *The gender specific apolipoprotein E genotype influence on the distribution of lipids and apolipoproteins in the population of Rochester, MN, I: pleiotropic effects on means and variances.* Am J Hum Gen. 1991; 49:1155-1166.
46. WILSON PW SCHAEFER EJ, LARSON MG, ORDOVAS JM. *Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease: a meta-analysis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1994; ; 16:1250-1255.
47. DALLONGEVILLE J, LUSSIER-CACAN S, DAVIGNON J. *Modulation of plasma triglyceride levels by apo E phenotype: a meta-analysis.* J Lipid Res 1992; 33:447-454.
48. CUMMING AM, ROBERTSON F. *Polymorphism at the apo E locus and the relation to the risk of coronary disease..* Clin Genet 1984; 25:310-313.
49. LENZEN HJ, ASSMANN G, BUCHWALSKY R, SCHULTE H. *Association of apolipoprotein E polymorphism, low density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease.* Clin Chem 1986; 32:778-781.
50. ETO M, WATANABE K, MAKINO Y. *Increased frequencies of apolipoprotein E2 and E3 alleles in patients with ischemic heart disease.* Clin Genet 1989; 35:186-188.
51. YAMAMURA T, TAJIMA S, MIYAKE Y, NOMURA S, YAMAMOTO A, HAZE K, et al. *Hyperlipoproteinemia as a risk factor for ischemic heart disease.* Jpn Circ J 1990; 54:448-456.
52. EICHNER JE, KULLER LH, ORCHARD TJ, GRANDITS GA, McCALLUM LM, FERREL RE, et al. *Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary heart disease.* Am J Cardiol 1993; 71:160-165.
53. LUC G, BARD J, ARVEILER D, EVANS A, CAMBOU J, BINGHAM A. *Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction: the ACTIM study.* Arterioscler Thromb 1994; 14:1412-1419.
54. WILSON PWF, MYERS RH, LARSON MG, ORDOVAS JM, WOLF PA, SHAEFER EJ. *Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease.* JAMA 1994; 272:1666-1671.
55. STEGARD JH, ZERBA KE, PEKKANEN J, ENHOLM C, NISSINEN A, SING CF. *Apolipoprotein E polymorphism predicts death coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men.* Circulation 1995; 91:265-269.

56. NASSAR BA, DUNN J, TITLE LM. *Relation of genetic polymorphisms of apolipoprotein E, angiotensin converting enzyme, apolipoprotein B-100, and glycoprotein IIIa and early-onset coronary heart disease.* Clin Biochem 1999; 32:275-282.
57. MOORE JH, REILLY SL, FERREL RE, SING CF. *The role of the apolipoprotein E polymorphism in the prediction of coronary artery disease age of onset.* Cilm Genet 1999;51:22-25.
58. RASLOVA K, SMOLKOVA B, VOHNOUT B, SCHIFFERDECKER B, POLEDNE R, DUSINKA M. *Apolipoprotein E genotypes in offspring with a positive and negative family history of premature myocardial infarction.* Clin Genet 1999, 53-387-390.
59. DE ANDRADE M, THANDI I, BROWN S. *Relationship of the apolipoprotein E polymorphism with carotid artery atherosclerosis.* Am J Hum Genet 1995;56:1379-1390.
60. BOER JM, FESKENS EJ, SCHOUTEN EG, HAVEKES LM, SEIDELL JC, KROMHOUT D. *Lipid profiles reflecting high and low risk for coronary heart disease: contribution of apolipoprotein E polymorphism and lifestyle.* Atherosclerosis 1998;136:395-402.
61. LAHOZ C, SCHAEFER EJ, CUPPLES LA, WILSON PFW, LEVY D, OSGOOD D, PARPOS S, PEDRO-BOTET J, DALY JA, ORDOVAS JM. *Apolipoprotein E genotype and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study.* Atherosclerosis; 2001;154:529-537.
62. HUANG Y, SCHWENDER SW, RALL SC, SANAN DA, MAHLEY RW. *Apolipoprotein E2 transgenic rabbits.* J Mol Chem 1997; 272:22685-22694.
63. SRIVASTA RA, SRIVASTA N, AVERNA M, LIN RC, KORACH KS, LUBAHN DB, SCHONFELD G. *Estrogen up-regulates apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via estrogen receptor alpha mediated pathway.* J Mol Chem 1997; 272:33360-33366.
64. ORDOVAS JM, SCHAEFER EJ. *Genes, variation of cholesterol and fat intake and serum lipids.* Curr Opin Lipidol 1999; 10:15-22.
65. ORDOVAS JM. *The genetics of serum lipid responsiveness to dietary interventions.* Proc Nutr Soc 1999;58:171-187.

66. RANTALA M, SAVOLAINEN MJ, KERNEN K, KESANIEMI YA. *Apolipoprotein E phenotype and diet-induced alteration in blood pressure*. Am J Clin Nutr 1997; 65:543-550.
67. AGUILAR CA, TALAVERA G, ORDOVAS JM, BARRIGUTE JA, GUILLEN LE, LECO ME, PEDRO-BOTET J, GONZALEZ- BARRANCO J, GOMEZ-PEREZ F, RULL J. 1999. *The apolipoprotein E4 allele is not associated with the abnormal lipid profile in a Native American population following its traditional lifestyle*. Atherosclerosis 142: 409-414. . 1999
68. KAMBOH MI, WEISS KM, FERREL ME: *Genetics studies of human apolipoprotein: XVI APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatán peninsula, México*. Clin Genet 1991; 29:26-32.
69. DEIANA L, PES GM, CARRU C. *Lack of influence of apolipoprotein E4 on lipoprotein levels in the island population of Sardinia*. Eur J Clin Invest 1998;28:290-294.
70. SANDHOLZER C, DELPORT R, VERMAAK H, UTERMANN G. *High frequency of the apo epsilon 4 allele in Khoi San South Africa*. Hum Genet 1995; 95:46-48.
71. GORDON DJ, RIFKIND BM: *High density lipoprotein: The clinical implications of recent studies*. N Engl J Med 1989; 321:1311-1315.
72. BROWN MS, GOLDSTEIN JL: *Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for the cholesterol deposition in atherosclerosis*. Ann Review Biochem 1983; 52:223-261.
73. TALL AR: *Plasma high density lipoprotein. Metabolism and relationship to atherosclerosis* J Clin Invest. 1990; 86:379-384.
74. FIELDING CJ, HAVEL RJ, TODD KM, YEO KE, SCHLOETTER MC, WEINBERG V, et al: *Effects of dietary cholesterol and fat saturation on plasma lipoprotein in a ethnically diverse population of healthy young men*. J Clin Invest 1995; 95:611-618
75. PATSCH W, OSTLUND R, KURSK I, LEVY R, SCHONFELD G: *Characterization of lipoprotein in a kindred with familial hypercholesterolemia*. J Lipid Res 1982; 23:1190-1205.
76. PARTHASARATHY S, KHOO JC, MILLER E, BARNET J, WITZTUM JL, STEINBERG D: *Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against*

- oxidative modification: Implication for a dietary prevention of atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:3894-3898.*
77. ASAKAWA J, TAKAHASHI N, RESENBLUM BB, NEEL, JV: *Two-dimensional gel studies of genetics variation in the proteins of Amerindians and Japanese. Hum Genet 1985; 70:222-230.*
78. SCACCHI R, CORBO RM, RICKARDS O, MANTUANO E, GUEVARA A, DE STEFANO GF: *Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa indians of Ecuador. Human Biology 1997; 69:375-382.*
79. CARILOU MA, KOKKOFITOU A, MANOLI P, CHRISTOU S, KARAGRIGORIOU A, MIDDLETON L: *Underexpression of the apolipoprotein E2 and E3 alleles in the Greek Cypriot population of Cyprus. Genetic Epidemiology 1995, 12:489-497.*
80. GERDES LU, GERDES C, HANSEN PS, KLAUSEN IB, FAERGEMAN O, DYERBERG J: *The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. Hum Genet 1996; 98:546-550.*
81. GENE M, MORENO P, EZQUERRA M, PRAT A, HUGUET E, ADROER R, et al: *Low apolipoprotein E e4 allele frequency in the population of Catalonia (Spain) determined by PCR-RFLP and laser fluorescent sequencer. Eur J Epidem 1997; 13:841-843.*
82. MASTANA SS, CALDERON R, PEÑA J, REDDY PH, PAPIHA SS: *Anthropology of the apolipoprotein E (apo E) gene: low frequency of apo E4 allele in Basques and in tribal (Baigia) populations of India. Ann Hum Biol 1998; 25:137-142.*
83. KAMBOH MI, BHATIA KK, FERREL RE: *Genetic of human apolipoproteins: XII. Populations genetics of apolipoproteins in Papua New Guinea. Am J Hum Biol 1990; 2:17-23.*
84. CORBO RM, SCACCHI R, MUREDDU L, MULAS G, ALFANO G: *Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of others European populations. Am Hum Genet 1995; 59:197-209.*

85. HALLMAN DM, BOERWINKLE E, SAHA N, SANDHOLZERC, MENZEL HJ, CZASAR A, et al: *The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of alleles frequencies and effects in nine populations*. Am J Hum Genet 1991; 49:338-349.
86. CREWS DE, KAMBOH MI, MANCILHA-CARVALHO JJ, KOTTKE B: *Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and II polymorphisms in Yanomami Indians of Northwestern of Brazil: association with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism*. Human Biol 1993; 65:211-224.
87. HAFFNER, SM, STERN MP, MIETTINEN H, ROBBINS D, HOWARD BV: *Apolipoprotein E polymorphism and LDL size in a biethnic population*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biol 1996; 16:1184-1188.
88. GAMBOA R, HERNANDEZ-PACHECO G, HESQUIO R, ZUÑIGA J, MASSÓ F, MONTAÑO LF, RAMOS-KURI M, ESTRADA J, GRANADOS J, VARGAS-ALARCÓN G. *Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo population of Mexico*. Hum Biol. 2000, 72: 975-981
89. EMI M, WU LL, ROBERTSON MA. *Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms*. Genomics 3:373-379.
90. FRIEDEWALD WT, LEVI RI, FREDRICKSON DS. *Estimation of concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma, without of the preparative ultracentrifuge*. Clin Chem. 1972, 18: 499-502.
91. WEISS, K.M., R.E. FERRELL, C.L. HANIS. *A new world syndrome of metabolic diseases with a genetic and evolutionary basis*. Yearbook Phys. Anthropol 1984; 27: 153-178.
92. TIRET L, De KNIFF P, MENZEL H, EHNHOLM C, NICAUD V, HAVEKES LM. *Apo E polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations: The EARS study*. Artheroscl Thromb. 1994; 14:1617-1244.
93. BRESLOW, J.L., V.I. ZANNIS, T.R. SANGIACOMO, J.L. THIRD, T. TRACY, C.J. GLUECK. *Studies of familial type III hyperlipoproteinemia using as a genetic marker the apoE phenotype E2/2*. J Lipid Res. 1982; 23: 1224-1235
94. CAVALLI-SFORZA LL, MENOZI P, PIAZZA A.. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton, NL: Princeton University Press, 1994, 321-325.1994

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

95. SWADESH, M. *Indian linguistic groups of Mexico*. 1959. Escuela Nacional de Antropología e Historia, México.
96. CLIFTON PM, KESTIN M, ABBEY M, DRYSDALE M, NESTEL PJ: *Relationship between sensitivity to dietary fat and dietary cholesterol*. *Arteriosclerosis* 1990; 10:394-401.
97. SAVOLAINEN MJ, RANTALA M, KERVINEN J, JARVI L, SUVANTO K, RANTALA T, et al: *Magnitude of dietary effects on plasma cholesterol concentration: Role of sex and apolipoprotein E phenotype*. *Atherosclerosis* 1991; 86:1145-152.
98. LARSON IA, ORDOVAS JM, DELUCA C, BARNARD JR, FEUSSNER G, SCHAEFER EJ. *Association of apolipoprotein (Apo) E genotype with plasma apo E levels*. *Atherosclerosis*. 2000.148: 327-335.
99. UTERMANN G. *Genetic polymorphism in apolipoprotein E: impact on plasma lipoprotein metabolism*. In: Gepaldi G, Tiengo A, Baggio G Jr, editors. *Diabetes, Obesity, and Hyperlipidemia, III*. Amsterdam: Elsevier 1995.: 1-28.
100. BREDIE SJ, VOGELAAR JM, DEMACKER PN, STALENHOF AF. *Apolipoprotein E polymorphism influences lipid phenotypic expression, but not the low density lipoprotein subfraction distribution in familial combined hyperlipidemia*. *Atherosclerosis* 1996; 126: 313-324.
101. MUROS M, RODRIGUEZ-FERRER C. *Apolipoprotein E polymorphism influence on lipid, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4*. *Atherosclerosis* 1996. 121: 13-21.
102. KAMBOH MI, ASTON CE, FERRELL RE, HAMMAN RF. *Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanic and non Hispanic whites*. 1993. *Atherosclerosis* 98: 201-211.
103. HEGELE RA, EVANS AJ, TU L, BRUNT JH, CONELLY PW. *A gene-gender interaction affecting plasma lipoproteins in a genetic isolate*. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 671-678.
104. BARTER PJ, CHANG LB, NEWNHAM HH, RYE KA, RAJARAM OV. *The interaction of cholesteryl ester transfer protein and unesterified fatty acids promotes a*

reduction in the particle size of high density lipoproteins. Biochem Biophys Acta. 1990; 1045: 81-89.

105. MARTIN LJ, CONNELLY PW, NANCOO D, WOOD N, ZHANG ZJ, MAGUIRE G, QUINET E, TALL AR, MARCEL YL, MCPHERSON R. *Cholesteryl ester transfer protein and high density lipoprotein responses to cholesterol feeding in men: relationship to apolipoprotein E genotype. J Lipid Res. 1993; 34: 437-446.*
106. CATTINL, PETRUCCO A, CAZZOLATO E, BON GB, BORELLI V, NARDON E, ZABUCCHI G, FONDA M, BORDIN P. *Low density lipoproteins apheresis decreases oxidized low density lipoproteins and monocyte adhesion to endothelial cells. ASAIO J. 1997; 43:209-213.*

ANEXOS

TECNICA DE EXTRACCION DE DNA POR EL METODO DE EXPULSION SALINA

1. Recolectar 8-10 ml de sangre total periférica con anticoagulante (EDTA).
2. En un tubo Falcon de 50 ml. Poner 40 ml de solución de lisis (SLR 1X) y el vaciar toda la sangre en el tubo. Mezclar vigorosamente la solución.
3. Centrifugar la solución a 1200 rpm/10 minutos
4. Quitar el sobrenadante con una pipeta con cuidado, sin tocar el precipitado
5. Agregar nuevamente sol. SLR 1X hasta 40ml. Y centrifugar a 1200 rpm/10 minutos
6. Quitar el sobrenadante , sin tocar el precipitado, hasta que el precipitado este limpio (sin restos de eritrocitos). En este paso se puede invertir el tubo y dejarlo escurrir. Repetir el lavado las veces que sea necesario hasta que el paquete este limpio (color blanco)
7. Agregar al tubo Falcon: *260µl de agua estéril; 160µl de buffer de proteinasa; 40µl de SDS al 20%, y 40µl de proteinasa K.*
8. Resuspender el paquete con la solución y transferirlo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Previamente marcado. Mezclar vigorosamente
9. Incubar a 37°C toda la noche. o incubar a 55°C durante 3-4 horas (en este caso agregar 20µl más de proteinasa K)
10. Terminada la incubación agregar 240µl de NaCl 5M. Mezclar vigorosamente y centrifugar a 14000 rpm/10 minutos
11. Recuperar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf previamente marcado sin tomar el precipitado
12. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm/10 minutos y recuperar el sobrenadante. Repetir este paso hasta que el sobrenadante no tenga sedimentos
13. Agregar etanol frío al 95% e invertir el tubo hasta que aparezca un precipitado blanco (DNA). *(Se recomienda dejarlo en el congelador unos minutos)*
14. Centrifugar a 14000 rpm/10 minutos

15. Se observa un botón blanco, se desecha el sobrenadante por decantación y se agrega etanol frío al 70%. (Esto con el propósito de lavar el precipitado)
16. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm/5 minutos
17. Se desecha el sobrenadante por decantación y se deja escurrir el tubo boca abajo
18. Secar el tubo a 37°C ó en el concentrador de DNA
19. Agregar de 50 a 100µl de agua destilada estéril ó en tris-EDTA (TE) y dejarlo a temperatura ambiente durante 2 horas hasta que se resuspenda el DNA en el agua.
20. Medir la concentración del DNA a 260 nm. La pureza se obtiene de medir el DNA a 260nm y las proteínas a 280nm, la relación entre 260/280 nos da la pureza. Este valor debe corresponder entre 1.7-1.8

PROCEDIMIENTO PARA AJUSTAR EL DNA

Abs a 260nm x 50ng (índice de densidad óptica) x 100µl (volumen de dilución) = [ng/µl]
 [ng/µl] x Vol total del tubo = ng totales en el tubo

Para ajustar a 200 ng/µl dividir los ng totales entre 200 (concentración deseada) y la resultante restarle el volumen que ya se tiene en el tubo. El resultado es la cantidad que hay que agregar de agua a mi tubo para que quede ajustado el DNA a la concentración deseada; esto es 200 ng por µl.

EJEMPLO:

Abs 260nm (0.0565) x 50ng x 100 (factor de dilución) = 282.5ng/ul
 282.5 x 90ul (vol.del tubo) = 25425mg en 90 ul (concentración total)
 25425/200 [concentración que deseo] = 127.125ul – 90 (vol que ya tengo) = 37.125ul que necesito agregar a mi tubo para tenerlo todo ajustado a 200ng/ul.

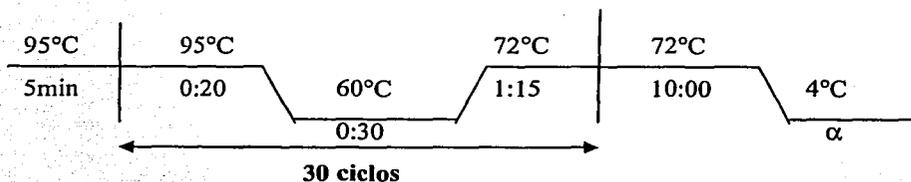
TÉCNICA DE PCR PARA APOLIPOPROTEINA E.

Mezcla que contiene todo lo necesario para realizar la amplificación

DNTP's (mezcla de deoxinucleotidos) 2 mM	4µl
Amortiguador de PCR 10X (Buffer)	2.5µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5µl
Iniciador derecho (F4)	2.5µl
Iniciador izquierdo (F6)	2.5µl
H ₂ O destilada	10.75µl
Taq polimerasa	125µl

- ❖ Se mezcla todo y se agrega 22.5µl a el tubo + 2.5µl de DNA=25µl Totales en cada tubo.

CONDICIONES PARA EL TERMOCICLADOR:



- ❖ Desnaturalización: 95°C durante 20 segundos
- ❖ Alinaemiento: 60°C durante 1 minuto
- ❖ Extensión: 72°C durante 1 minuto 15 segundos.
- ❖ Extension final 72°C durante 10 minutos

Todo el proceso se realiza durante 30 ciclos.

- Una vez finalizado el proceso de amplificación, verificar el amplificado en gel de agarosa al 2%, agregando 5µl de colorante naranja G + 5µl del amplificado. Esta mezcla se corre en un gel de agarosa a 70 volts durante 20 minutos. Las bandas son

observadas en un trasiluminador y se compara el tamaño de las bandas con un marcador de peso molecular conocido.

- Una vez verificada la amplificación y corroborando el tamaño del amplificado se procede a digerir con una enzima de restricción, en este caso se utilizó la HhaI o CfoI agregando 2µl del buffer correspondiente + 1µl de la enzima (HhaI o CfoI) + 17µl del amplificado
- Incubar a 37°C durante 3 horas.
- Después de la incubación la muestra se corre en un gel de acrilamida al 10%
- Cargar 10µl de la mezcla de DNA (amplificado y digerido). Utilizar el marcador de peso molecular *phi X174/hinf I*

INICIADORES UTILIZADOS:

F4: 5'- ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3'

F6: 5'- TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG GA-3'

MEZCLA DE dNTP'S (DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE)

Los dNTP (Promega) estan a una concentración original de 100 mM, cada uno(dTTP, dGTP, dATP, dCTP.). Por lo tanto:

- ◆ Tomar 125 µl de cada uno (500µl final) y agregar 9.5 ml de agua grado biología molecular (volumen final 10 ml.)
- ◆ La concentración final es: [1.25]mM

PREPARACION DEL GEL DE ACRILAMIDA AL 10%

Se lavan los vidrios con Extran y se enjuagan con agua corriente, posteriormente se enjuaga con agua destilada y finalmente se limpian con alcohol al 96°.

Se arman los vidrios con los separadores laterales y el inferior y se sujetan con clips rodeando todo el vidrio. Se prepara la solución de acrilamida:

- ❖ Acrilamida al 30% -----16,5 ml
- ❖ TBE 10X-----5 ml
- ❖ Persulfato de amonio al 10%-----400µl
- ❖ Temed-----80µl
- ❖ Agua destilada-----28ml.

Se mezcla y se vacía en el molde e inmediatamente se coloca el peine. Se deja polimerizar (aproximadamente 20-30 minutos) y se monta en la cámara de electroforesis. Se llena la cámara con solución amortiguadora TBE 1X.

Se corren las muestras durante 5 horas a 80 volts.

REVELADO DEL GEL DE ACRILAMIDA CON NITRATO DE PLATA

El gel de acrilamida al 10% se revela con una solución de nitrato de plata:

1. Se lavan los recipientes para el revelado del gel con agua corriente y con agua destilada, y después se enjuagan con la solución fijadora.
2. Se desmonta el gel de acrilamida y se coloca en el recipiente con la solución fijadora (aproximadamente 100ml.) se deja embebido con agitación suave durante 10 a 15 minutos.
3. Se desecha toda la solución y se agrega la solución de tinción (100ml) cuidando de que al vaciar la solución no caiga directamente sobre el gel. Se deja en agitación leve durante 5 minutos
4. Se desecha toda la solución y se agregan unos 10 ml de solución de revelado, cuidando que no caiga directamente sobre el gel, se enjuaga el recipiente con la solución y se desecha. Se enjuaga con agua destilada 10 ml. Y se agrega 90 ml de solución de revelado, durante unos 10 minutos o hasta que se visualizen las bandas en el gel, este se tornara de color amarillo.
5. Se para la reacción con una solución de ácido acético al 1.5 %, en un volumen de 100 ml.
6. Se coloca el gel de acrilamida al 10% en luz blanca (megatoscopio) y se interpretan las bandas de acuerdo a su polimorfismo y se toma una foto en papel (polaroid).

PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA AL 2%

- ◆ Se pesa 2 gramos de agarosa LE (Promega, Wi. USA), se disuelve en 5ml de TBE 10X y 95 ml de agua destilada. Para un volumen final de 100 ml..
- ◆ Se calienta hasta que hierva y después se deja enfriar hasta 40° C aproximadamente.
- ◆ Agregar 1.5µl de bromuro de etidio. Mezclar perfectamente.
- ◆ Vaciar sobre la caja del gel y dejarlo secar cuando menos unos 25 minutos antes de usarlo.
- ◆ Para correr el DNA mezclarlo con una solución "gel loading" de rojo de cresol a razón de 3:10µl
- ◆ Vaciar las muestras en el gel sumergido en TBE 1X
- ◆ Correr el gel a 80 mV durante 30 minutos aproximadamente
- ◆ Se visualiza el gel en una lampara de luz ultravioleta.

PREPARACIÓN DEL TBE 10X (para preparar 1000ml)

Pesar Tris base 54grs
Ácido bórico 27.5 grs
0.5M de EDTA (pH=8.0) 20ml
Aforar con agua desionizada a pH 8.3

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN SLR 20X (Para preparar 1 litro)

Tris 2 M..... 12.12 grs
MgCl₂ 0.12 M 24.8 grs
NaCl₂ 5.8 grs
Para preparar a 1X tomar 50 ml de la solución 20 X y aforar a 1 litro.

PREPARACION DE LA ACRILAMIDA AL 30% (Para un volumen de 100 ml)

Pesar acrilamida (grado biología molecular) 29grs
Pesar N´N´Methilenebisacrilamida 1 gr
Disolver en 100 ml de agua destilada. Filtrar en filtros de celulosa de 0.45µs de diámetro.
Guardar en botellas ambar a temperatura ambiente.

PROTEINASA K

En la presentación de [100 mg], agregar 10 ml de agua destilada y desionizada para obtener una concentración final de [10 mg/ml]

PREPARACIÓN DEL PERSULFATO DE AMONIO AL 10%

Pesar 10 grs de Persulfato de amonio en un volumen de 100 ml.

PREPARACION DE SOLUCIONES PARA TINCION EN PLATA DE GELES DE ACRILAMIDA

SOLUCION FIJADORA DEL GEL (10-15 min)

Etanol al 10%-----agregar 30 ml de etanol al 96%.
Acido Acético al 0.5%----- agregar 1.5 ml de ácido acético puro.
Aforar a 300 ml con agua destilada.

SOLUCION DE TINCION (5 min)

AgNO₃ 0.2%-----pesar 200mg
Aforar con la solución fijadora a 100ml y disolver.

SOLUCION DE REVELADO (10min)

NaOH al 3% agregar 3grs.

FORMALDHEIDO agregar 300µl

Aforar a 100 ml.con agua destilada y disolver.

ACIDO ACETICO AL 1.5% PARA PARAR LA REACCION.

PERSULFATO DE AMONIO AL 10% -----100mg/1ml.

Ricardo Gamboa,* Guadalupe Hernández-Pacheco,* Ramiro Hesiquio,* Joaquín Zuñiga,** Julio Granados,** Gilberto Vargas-Alarcón.*&

Palabras clave: Lipoproteínas. Apolipoproteína E. Susceptibilidad genética.
Key words: Lipoprotein. Apolipoprotein E. Genetic susceptibility.

INTRODUCCIÓN

El colesterol y sus ésteres al igual que otros triglicéridos y fosfolípidos son prácticamente insolubles en agua. No obstante estos lípidos se transportan desde el tejido de origen (hígado, donde son sintetizados o intestino donde son absorbidos) hasta los tejidos donde son almacenados o consumidos. Para transportar los lípidos en la sangre, estos son empaquetados en macromoléculas de forma esférica conocidas como lipoproteínas, las cuales están formadas por un centro de características hidrófobas en el cual están contenidos los triglicéridos y el colesterol esterificado, incluyen además una capa superficial más hidrófila que contiene colesterol no esterificado, fosfolípidos y proteínas específicas denominadas apolipoproteínas. La porción proteica de las lipoproteínas la constituyen estas apolipoproteínas que, además de tener funciones estructurales pueden actuar como factores o activadores de enzimas y participan en el reconocimiento de las lipoproteínas por sus receptores y en la transferencia de lípidos entre diferentes lipoproteínas.¹

Las distintas lipoproteínas difieren entre sí por la proporción de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos que contienen, así como por las distintas apolipoproteínas con las cuales se asocian. En la actualidad, las lipoproteínas plasmáticas han sido clasificadas de acuerdo a su densidad en: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, el inglés very low density lipoproteins), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, intermediate density lipoproteins), lipoproteínas de baja densidad (LDL, low density lipoproteins), lipoproteína a y lipoproteínas de alta densidad (HDL, high density lipoproteins).¹ Cada clase de lipoproteína

tiene una función específica, determinada por su sitio de síntesis, composición lipídica y contenido de apolipoproteínas. Los quilomicrones tienen la función de transportar la grasa exógena desde el intestino hasta el hígado, mientras el transporte de los lípidos desde el hígado hasta los tejidos periféricos y de aquí nuevamente hacia el hígado, se realiza a través de las VLDL, IDL, LDL y HDL que constituyen el denominado transporte de los lípidos endógenos¹ (Figura 1).

Cada una de las apolipoproteínas que posee a su vez la lipoproteína, tiene una función específica en el complejo macromolecular. Algunas de ellas únicamente son estructurales como la B48, otras como la apoA1, la apoAIV y la apoCI activan la lecitincolesterol-aciltransferasa, otras como la apoCII y CIII activan e inhiben respectivamente a la lipoproteinlipasa; finalmente, algunas de ellas actúan uniéndose a receptores específicos como ocurre con la apoB100 y la apoE. Entre las lipoproteínas del plasma humano, existen por lo menos nueve apolipoproteínas diferentes, las cuales se distinguen por su tamaño, reacciones con anticuerpos específicos y distribución característica en las distintas clases de lipoproteínas (Tabla 1).

APOLIPOPROTEÍNA E

La apolipoproteína E (apo E) es una proteína plasmática identificada por primera vez en humanos en 1973,¹ posteriormente fue identificada y caracterizada en otras especies de las cuales se han derivado modelos para poder estudiar y caracterizar de manera extensa dicha apolipoproteína. La apo-E es una glicoproteína de 299 aminoácidos rica en arginina, con un peso molecular de 34 200 Da.² Forma parte de la estructu-

* Sección de Biología Celular. Departamento de Fisiología. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México, D.F.

** Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", México, D.F.

& Departamento de Biología Molecular. Escuela de Medicina. Universidad Panamericana, México, D.F.

Recepción: 6 de noviembre de 1998.

Aceptado: 13 de enero de 1999.

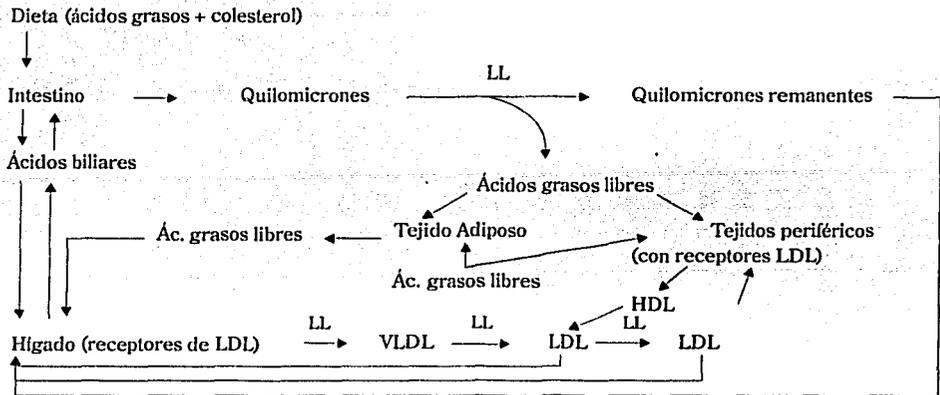


Fig. 1: Esquema general del metabolismo de los quilomicrones, VLDL, IDL, LDL, HDL y Quilomicrones remanentes. (LL, lipasa lipoproteica).

Tabla I
Apolipoproteínas de las lipoproteínas plasmáticas

Apolipoproteínas	Lipoproteína asociada	Función
ApoA1	HDL	Estructural y activa la LCAT
ApoAII	HDL	Estructural y activa la LPL
Apo B-48	Quilomicrones	Estructural
ApoB100	VLDL, LDL	Estructural y se fija al receptor LDL
ApoC1	VLDL, HDL	Activa la LCAT
ApoCII	Quilomicrones, VLDL, HDL	Activa la LPL
ApoCIII	Quilomicrones, VLDL, HDL	Inhibe la LPL
ApoD	HDL	—
Apo E	Quilomicrones, VLDL, HDL	Ligando para receptor

Modificado de: Vance D.E. & Vance J.E. (1985) *Biochemistry of Lipids and Membranes*.
The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA.
Abreviaturas: LCAT: Lecitincolesterol-aciltransferasa; LPL: Lipoproteínlipasa.

ra de diversas lipoproteínas como los quilomicrones circulantes, los quilomicrones remanentes, las lipoproteínas de muy baja densidad, las lipoproteínas de densidad intermedia y las lipoproteínas de alta densidad. La apo E tiene un papel esencial en el movimiento de lípidos entre los tejidos³ y sirve como ligando para receptores de lipoproteínas de baja densidad; a través de su interacción con estos receptores participa en el transporte de triglicéridos desde el hígado hasta los tejidos periféricos. Por su presencia en las lipoproteínas de alta densidad (HDL), participa en la redistribución del colesterol y de otros lípidos entre los tejidos y también parece estar involucrada en la reparación de tejidos dañados.¹ Se piensa que el com-

plejo HDL-apo E también está involucrado en la liberación de colesterol HDL mediado por un receptor hacia el hígado,⁴ en la hidrólisis hepática mediada por una lipasa de los fosfolípidos HDL,⁵ en la esterificación del colesterol plasmático,^{6,7} en el metabolismo postprandial de triglicéridos⁸ y en el reflujo de colesterol derivado de células.^{9,10}

Otras funciones en las cuales también parece intervenir la apo E incluyen la inmunoregulación y modulación del crecimiento celular así como la diferenciación celular.³

La apo E es sintetizada por diferentes órganos, entre ellos el cerebro, el bazo y el riñón, aunque la vía principal de síntesis de apo E es el hígado.³

VARIANTES POLIMÓRFICAS DE LA APO E

El gen que codifica para la apo E está localizado en el brazo largo del cromosoma 19 en una familia de genes, donde están incluidos los genes para apo C-I, C-I' (un pseudogen) y CII,¹¹ dicho gen incluye 4 exones y tiene un tamaño de 3.7 Kb. El receptor de las LDL y de la apo CII también está localizado en este cromosoma.¹² La secuencia promotora TATAATT se encuentra aproximadamente a una distancia de 30 pares de bases arriba del sitio de iniciación transcripcional.

El gen de apo E codifica para tres alelos llamados E2, E3 y E4, los cuales difieren entre sí por una unidad de carga neta debido a la sustitución de una base en dos codones en el cuarto exón del gene.¹³⁻¹⁵ Debido a que estos alelos se heredan de forma mendeliana codominante, se encuentran 6 fenotipos de apo E que son: apoE2/2, E3/2, E3/3, E4/2, E4/3 y E4/4, los cuales difieren por la sustitución de un aminoácido en uno o dos de los sitios polimórficos (residuos 112 y 158).^{15,16} La apo E4 difiere de la apo E3 en la sustitución de una arginina por una cisteína en el residuo 112, mientras que la apoE2 difiere de la apoE3 en la sustitución de una cisteína por una arginina en el residuo 158. Debido a la similitud en los efectos fisiológicos de

los diferentes alelos de esta proteína, éstos son comúnmente agrupados en el alelo E2 (que incluye los fenotipos 4/2, 3/2 y 2/2), el grupo del alelo E3 (que incluye el fenotipo 3/3) y el grupo del alelo E4 (que incluye los fenotipos 4/4 y 4/3).

DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIANTES DE APOE EN DISTINTAS POBLACIONES

Debido a la influencia que tienen los diferentes fenotipos de apoE en los niveles de lípidos y sus relaciones con enfermedades como la aterosclerosis, se ha analizado la distribución de sus frecuencias en diversas poblaciones^{17,28} (Tablas II y III). Los datos reportados a la fecha establecen que el alelo más frecuente en todas las poblaciones estudiadas es el E3 y por tanto el fenotipo más común es el E3/3; sin embargo, la frecuencia tanto del alelo como del fenotipo varía según la población estudiada. Existe una mayor diferencia en las frecuencias de los alelos E2 y E4 así como en los fenotipos en los cuales están incluidos dichos alelos los cuales varían importantemente en los distintos grupos étnicos estudiados. Los individuos caucásicos en general presentan una frecuencia más alta de E2, mientras que las poblaciones africanas pre-

Tabla II
Distribución de los alelos de la apo E en diversas poblaciones

País	Población	N	Referencias	Alelos		
				Apo E2	Apo E3	Apo E4
				Frecuencia %		
México	Indígenas Mazatecos	n = 75	Datos person.	0	90.0	10.0
México	Mestizos	n = 89	Datos person.	0.5	91.0	8.4
México	Indígenas Mayas	n = 135	Kamboh, 1991	0	91.1	8.9
U.S.A.	Mex-Americ	n = 210	Haffner, 1996	2.3	90.4	7.1
Brasil	Indígenas Yanomaml	n = 96	Crews, 1993	0	84.3	15.6
Ecuador	Indígenas Cayapa	n = 91	Scacchi, 1997	0	72.0	28.0
Groenlandia	Aborígenes Nuuk	n = 100	Gerdes, 1996	2.5	79.0	18.5
Groenlandia	Aborígenes Anmassalik	n = 78	Gerdes, 1996	0	76.9	23.1
Nueva Guinea*	Aborígenes Papua	n = 110	Kamboh, 1990	14.6	48.6	36.8
USA	Caucásicos	n = 117	Mastana, 1998	14.0	74.0	12.0
Finlandia	Caucásicos	n = 151	Hallman, 1991	4.3	79.1	16.5
Israel	Caucásicos	n = 27	Mastana, 1998	16.6	66.6	16.6
Grecia	Caucásicos	n = 335	Caroliou, 1995	5.3	87.6	7.0
España	Caucásicos	n = 226	Gené, 1997	6.4	81.0	12.6
Italia*	Caucásicos	n = 209	Corbo, 1995	6.2	86.7	7.2
China*	Orientales	n = 95	Hallman, 1991	5.3	88.3	6.4
Japón	Orientales	n = 333	Hallman, 1991	4.2	86.3	9.4
Nigeria*	Negroides	n = 365	Hallman, 1991	2.7	67.7	29.6

* En estas poblaciones no se reportan los fenotipos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla III
Distribución de los fenotipos de la apo E en diversas poblaciones

País	Población	N	Referencia	Fenotipos					
				Apo 2/2	Apo 2/3	Apo 3/3	Apo 4/2	Apo 4/3	Apo 4/4
México	Indígenas Mazatecos	n = 75	Datos person.	0	0	81.3	0	17.3	1.3
México	Mestizos	n = 89	Datos person.	0	1.0	82.0	0	16.9	0
México	Indígenas Mayas	n = 135	Kamboli, 1991	0	0	82.2	0	17.7	0
U.S.A.	Mex-Americ	n = 210	Haffner, 1996	0	4.7	81.9	0	12.3	0.9
Brasil	Indígenas Yanomami	n = 96	Crews, 1993	0	0	68.7	0	31.2	0
Ecuador	Indígenas Cayapa	n = 91	Scacchi, 1997	0	0	49.4	0	45.0	3
Groenlandia	Aborígenes Nuuk	n = 100	Gerdes, 1996	0	4	62.0	1.0	30.0	3
Groenlandia	Aborígenes Ammassalik	n = 78	Gerdes, 1996	0	0	57.6	0	38.4	3.8
USA	Caucásicos	n = 117	Mastana, 1998	2.0	21.0	55.0	3.0	18.0	1.4
Finlandia	Caucásicos	n = 151	Hallman, 1991	0	7.2	62.2	1.3	26.4	2.6
Israel	Caucásicos	n = 27	Mastana, 1998	0	33.3	37.0	0	25.9	3.7
Grecia	Caucásicos	n = 335	Caroliou, 1995	0.3	6.9	75.3	0.9	15.0	1.5
España	Caucásicos	n = 226	Gené, 1997	0.3	9.5	76.4	0.6	12.8	0.3

sentan una frecuencia alta del alelo E4. Por su parte, las poblaciones indígenas americanas estudiadas hasta la fecha básicamente presentan las frecuencias más elevadas de E3 y algunas de ellas principalmente las sudamericanas presentan también frecuencia alta del alelo E4. Los estudios en la población mestiza e indígena de México muestran frecuencias similares de los alelos de apoE cuando se comparan entre ellas, sin embargo, varían al compararse con grupos caucásicos e indígenas de Sudamérica. De manera interesante, todas las poblaciones indígenas americanas incluyendo las mexicanas no tienen el alelo E2. Dicho alelo tampoco existe en poblaciones aborígenes de Groenlandia y de Australia, mientras que se ha reportado su alta frecuencia en poblaciones chinas y en aborígenes de Malasia y Nueva Guinea. Por su parte la frecuencia del alelo E4 es alta en poblaciones de Groenlandia, Finlandia y en aborígenes de Malasia, Nueva Guinea y Australia. Por otro lado, la frecuencia de E4 es baja en indígenas mexicanos, así como en poblaciones Chinas, Turcas, Italianas, Españolas y Griegas. En Europa, se ha reportado un gradiente de la frecuencia del alelo E4 al estudiar poblaciones del norte y del sur, sucediendo lo contrario con la frecuencia del alelo E3.

IMPLICACIONES CLÍNICAS

La apolipoproteína E tiene un papel importante como determinante de los niveles de lípidos en el plasma y

se ha relacionado con daño al miocardio. Como ya se mencionó, tiene tres alelos comunes que codifican para tres isoformas E2, E3 y E4. La combinación de estos tres alelos da por resultado los seis fenotipos, entre los que están tres homocigotos E2/2, E3/3 y E4/4 y tres heterocigotos E3/2, E4/3 y E4/2.

La presencia de alguno de los alelos mencionados se ha asociado con alteraciones en los niveles de lípidos y en el riesgo de adquirir alguna enfermedad cardiovascular. Por ejemplo, el alelo E2 muestra deficiencia de unión con su receptor y se asocia con niveles bajos de colesterol total y con el desarrollo de hiperlipoproteinemia tipo III.^{29,31} La presencia de dicho alelo conlleva disminución de los niveles de colesterol y betalipoproteína. Por otro lado, el alelo E4 si bien presenta unión normal con su receptor, se asocia también con concentración elevada de colesterol total y de LDL en el plasma, lo que a su vez también esta asociado con incremento en el riesgo de daño coronario.^{13,29,35} Se ha reportado una alta frecuencia del alelo E4 en pacientes con enfermedad coronaria e infarto al miocardio en algunas poblaciones estudiadas. De la misma manera, los individuos que presentan este alelo tienen una frecuencia mayor de calcificación aórtica que los que presentan cualquiera de las otras dos variantes (E2 o E3).³⁶ Por otro lado, la presencia de ciertos fenotipos como E4/4 y E4/3 se asocia con un incremento en los niveles de colesterol-LDL, mientras que dichos niveles están disminuidos en individuos con los fenotipos E3/2 y E2/2. Final-

mente, parece existir un gradiente de asociación de los fenotipos E3/4, E3/3 y E3/2 con la presencia de lesiones ateroscleróticas en algunas poblaciones, siendo la más fuerte con el fenotipo E3/4.^{29,30}

Los individuos con fenotipos considerados del grupo E4 (E4/4 y E4/3) presentan una mayor eficacia en la absorción de colesterol y por tanto, disminuyen la síntesis de colesterol y la remoción de LDL en apo-B.³⁷⁻³⁹ Debido a que existen diferencias importantes en la afinidad de unión de apo-E4 (alta afinidad) y apo-E2 (baja afinidad) hacia los receptores LDL,¹⁶ la frecuencia en el aclaramiento postprandial de las lipoproteínas remanentes es baja en sujetos con el fenotipo apoE2/2 y altas en sujetos con fenotipo apoE4/4.¹⁶ Además, los sujetos con fenotipo E4 frecuentemente responden mejor a las modificaciones en la dieta con colesterol y contenidos grasos que los individuos con fenotipo E2.^{40,41} Lo anterior sugiere que la apo E también está involucrada en modificaciones metabólicas y hemodinámicas relacionadas con la dieta.

A través de estudios epidemiológicos se ha demostrado que la incidencia de daño en arterias coronarias está inversamente relacionado con la concentración de lipoproteínas de alta densidad en el plasma (HDL).^{45,46} Se piensa que las HDL inhiben la aterogénesis debido a que promueven un exceso en el flujo de colesterol desde los macrófagos cargados de lípidos¹⁶ y mediante el transporte del exceso de colesterol desde el plasma hacia el hígado por una

excreción eventual en la bilis (proceso referido como transporte de colesterol inverso).^{47,48} Las HDL también intervienen en otras funciones anti-aterogénicas como es el aclaramiento plasmático de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TLR),⁴⁹ inhibición en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)⁵⁰ y la inhibición en la expresión de células de adhesión endotelial.

La participación de los fenotipos de apoE en la susceptibilidad a diversas enfermedades como el infarto al miocardio y enfermedades coronarias ha sido evaluada en diversas poblaciones utilizando grupos control del mismo origen étnico^{51,60} (Tablas IV y V). Dichos datos muestran que el porcentaje de pacientes con problemas cardiovasculares que muestran el fenotipo E4/4 es igual o excede la proporción observada en los sujetos control. Similarmemente, el fenotipo E3/4 es más común en los pacientes que en los controles. Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de los fenotipos E2/2 o E2/3 al comparar los pacientes con los sujetos control.

CONCLUSIONES

Los estudios en diversas poblaciones establecen que la frecuencia tanto de los alelos como de los fenotipos de apoE varía considerablemente, principalmente en lo que se refiere a los alelos E2 y E4. Ambos parecen

Tabla IV
Distribución de los fenotipos de apo-E en pacientes masculinos con IM o EIC y su comparación con sujetos control

Referencia	Enfermedad	Casos n controles n	Fenotipo		apo E, %			
			apo 2/2	apo 2/3	apo 3/3	apo 3/4	apo 2/4	apo 4/4
Cumming 1984	IM	194	0	7.2	55.2	4.6	30.4	2.6
		400*	0.5	12.7	58.3	2.7	24.8	1.0
Lenzen 1986	IM	470	0.2	8.9	63.2	1.8	23.9	2.1
		624	1.2	10.7	63	3.2	19.9	2.1
Eto 1989	EIC	55	1.8	10.9	52.7	0	30.9	3.6
		576*	0.3	6.1	71.9	0.7	19.3	1.7
Yamamura 1990	EIC	156	1.3	7.7	70.5	0.6	15.4	4.5
		208*	0.5	11.6	68.3	1.0	17.8	1.0
Eichner 1993	EIC Muerte o IM	206	0.5	11.7	53.4	1.9	29.6	2.9
		412*	0.5	8.5	67.0	1.0	20.6	2.4
Luc 1994	IM	574	0.5	9.4	61.3	2.4	23.2	3.1
		680	0.9	13.5	62.9	2.1	18.5	2.1
Wilson 1994	EIC	145	1.4	15.2	52.4	2.8	23.4	4.8
		889	0.6	13.5	62.2	2.1	19.0	2.6
Stengard 1995	EIC Muerte	28	0	3.6	57.1	7.1	28.6	3.6
		269	0	5.6	69.5	1.5	22.7	0.7
Stengard 1995	EIC Muerte	43	0	2.3	41.8	7.0	48.8	0
		326	0	8.9	58.9	4.0	28.2	0

Fenotipos de la apo-E, EIC e IM en hombres. * El sexo de los sujetos control no fue especificado, y el mismo grupo control fue utilizado para la comparación de EIC entre hombres y mujeres. IM: Infarto al miocardio, EIC: Enfermedad isquémica coronaria.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla V
Distribución de los fenotipos de la apo-E en pacientes femeninos con IM o EIC, y su comparación con sujetos de control

Referencia	Enfermedad	Casos n controles n	Fenotipo apo E, %					
			apo 2/2	apo 2/3	apo 3/3	apo 3/4	apo 2/4	apo 4/4
Utermann 1984	IM	523	1.3	13.0	63.7	2.1	17.6	2.3
		1031	1.0	12.0	59.8	1.5	22.9	2.8
Cumming 1984	IM	45	0.0	8.9	46.7	2.2	40.0	2.2
		400	0.4	12.7	58.4	2.7	24.7	1.1
Eto 1989	EIC	54	1.9	13.0	55.6	1.9	27.8	0.0
		576	0.3	6.1	71.9	0.7	19.3	1.7
Yamamura 1990	EIC	38	0.0	0.0	63.2	2.6	26.2	7.9
		208	0.5	11.5	68.3	1.0	17.8	1.0
Wilson 1994	EIC	44	0.0	11.4	56.8	0.0	27.3	4.5
		872	0.3	13.9	63.5	1.1	18.1	3.0

Fenotipos de la apo-E, EIC e IM en mujeres y en donde el sexo no fue especificado. IM: Infarto al miocardio
 EIC: Enfermedad isquémica coronaria.

ser los más importantes en cuanto a la asociación con los niveles de lípidos y su asociación con el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Los sujetos portadores del alelo E4 tienen mayor riesgo para desarrollar enfermedad coronaria y también enfermedad de Alzheimer, mientras que el fenotipo E2/2 se asocia con hiperlipidemia tipo III. En varios países, la presencia del alelo E4 sigue un gradiente geográfico de acuerdo a la frecuencia de enfermedades cardiovasculares, tal es el caso del continente europeo donde la mayor frecuencia de la enfermedad en el norte correlaciona con la alta frecuencia del alelo E4, sucediendo lo contrario en las poblaciones mediterráneas. Las poblaciones china y japonesa tradicionalmente presentan baja prevalencia de enfermedades coronarias lo cual parece correlacionar con la baja frecuencia del alelo E4 que presentan. Por lo contrario, los reportes de alta frecuencia de dicho alelo en la población de Finlandia sugieren que este alelo podría estar contribuyendo a la alta prevalencia de enfermedades coronarias en esta población. Los datos reportados en poblaciones mestizas e indígenas de México (Mayas y Mazatecos) establecen también una baja frecuencia del alelo E4 con frecuencias similares a las reportadas en poblaciones orientales. Esta baja frecuencia podría correlacionar con la baja prevalencia de enfermedades coronarias

en estas poblaciones comparadas con las poblaciones europeas. El mecanismo por el cual el alelo E4 puede incrementar el riesgo de enfermedad coronaria no está bien definido, sin embargo, en el modelo experimental de ratones transgénicos con deficiencia de apoE, éstos tienden a desarrollar niveles altos de lipoproteínas remanentes y lesiones arteriales. Por otro lado, cepas murinas con sobreexpresión de apoE muestran incremento en el aclaramiento de partículas que contiene apoB, además de reducidos niveles de colesterol y triglicéridos en plasma. Algunos estudios clínicos han mostrado que los niveles de apoE tienden a ser más altos en individuos con el alelo E2, intermedios en aquéllos con E3 y bajos en aquéllos con E4. Todas estas variaciones por tanto pueden de alguna forma condicionar el desarrollo de enfermedad cardiovascular en los portadores de alguno de los alelos descritos. Debido a la importancia que tienen las variantes de apoE en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades y puesto que las frecuencias de dicha apolipoproteína varían de una población a otra, es importante estudiar dicho polimorfismo en la población mexicana con el fin de relacionar la frecuencia de apoE con ciertas enfermedades, principalmente cardiovasculares que ocurren en nuestra población.

REFERENCIAS

- MAHALEY RW. *Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.* Science 1988; 240:622-630.
- SHORE B, SHORE VG. *Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins: Separation of species differing in protein components.* Biochemistry 1973; 12:502-507.
- SHELBURNE FA, QUARFORDT SH. *A new apoprotein of human plasma very low density lipoproteins.* J Biol Chem 1974; 249:1428-1433.
- MAHALEY RW, INNERARITY TL, WEISGRABER KH. *Alteration in metabolic activity of plasma lipoprotein following selective chemical modification of the apoprotein.* Ann NY Acad Sci 1980; 348:265-277.
- THUREN T, WEISGRABER TH, SISSON P, WAITE M. *Role of apoprotein E in hepatic lipase catalyzed hydrolysis of phospholipid in high-density lipoproteins.* Biochemistry 1992; 31: 2332-2338.

6. FIELDING CJ, FIELDING PE: *Molecular physiology of reverse cholesterol transport*. J Lipid Res 1995; 95:611-618.
7. ZORICH N, JONAS A, POWNALL HS: *Activation of lecithin cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein E in discoidal complex with lipids*. J Biol Chem 1985; 260:8831-8837.
8. BLUM CB: *Dynamics of apolipoprotein E metabolism in humans*. J Lipid Res 1982; 23:1308-1316.
9. HUANG DY, GOEDERT M, JAKES R, WEISGRABER KH, GARNER CC, SAUDERS AM: *Isoform specific interaction of apolipoprotein E with the microtubule associated protein MAP2c: Implication for Alzheimer's disease*. Neurosci Lett 1994; 82:55-58.
10. HUANG DY, VON ECKARDSTEIN A, WU S, ASSMANN G: *Effects of apolipoprotein E polymorphism on uptake and transfer of cell-derived cholesterol in plasma*. J Clin Invest 1995; 96:2693-2701.
11. MYKLEBOST O, ROGNE S: *A physical map of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 19*. Hum Genet 1988; 82:244-247.
12. FRANCKE U, BROWN MS, GOLDSTEIN JL: *Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: synthesis for a receptor, a ligand, and a genetic disease*. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:2826-2830.
13. UTERMANN G, HESS M, STEINMETZ: *Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man*. Nature 1977; 269:604-607.
14. BRESLOW JL: *Familial disorders of high density lipoprotein metabolism*. En Scriver CR, et al (eds). The metabolic basis of inherited disease 6th Ed. New York. Mc Graw Hill 1989; 1251-1266.
15. WEISGRABER KH, RALL SC, MAHLEY RW: *Human E apoprotein heterogeneity: Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo E isoforms*. J Biol Chem 1981; 256:9077-9083.
16. WEISGRABER KH, INNAKARITY TL, MAHLEY RW: *Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human apo E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site*. J Biol Chem 1982; 257:2518-2521.
17. ASAKAWA J, TAKAHASHI N, RESENBLUM BB, NEEL JV: *Two-dimensional gel studies of genetics variation in the proteins of Amerindians and Japanese*. Hum Genet 1985; 70:222-230.
18. SCACCHI R, CORBO RM, RICKARDS O, MANTUANO E, GUEVARA A, DE STEFANO GF: *Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cuyapa indians of Ecuador*. Hum Biol 1997; 69:375-382.
19. CARIOLOU MA, KOKKOFITOU A, MANOLI P, CHRISTOU S, KARAGRIGORIOU A, MIDDLETON L: *Underexpression of the apolipoprotein E2 and E3 alleles in the Greek Cypriot population of Cyprus*. Genet Epidemiol 1995; 12:489-497.
20. GERDES LU, GERDES C, HANSEN PS, KLAUSEN IB, FAERGEMAN O, DYERBERG J: *The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective*. Hum Genet 1996; 98:546-550.
21. GENE M, MORENO P, EZQUERRA M, PRAT A, HUGUET E, ADROER R, ET AL: *Low apolipoprotein E ε4 allele frequency in the population of Catalonia (Spain) determined by PCR-RFLP and laser fluorescent sequencer*. Eur J Epidemiol 1997; 13:841-843.
22. MASTANA SS, CALDERON R, PENA J, REDDY PH, PAPIHA SS: *Anthropology of the apolipoprotein E (apo E) gene: low frequency of apo E4 allele in Basques and in tribal (Baigia) populations of India*. Ann Hum Biol 1998; 25:137-142.
23. KAMBOH MI, WEISS KM, FERREL ME: *Genetics studies of human apolipoprotein: XVI APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan peninsula, Mexico*. Clin Genet 1991; 29:26-32.
24. KAMBOH MI, BHATIA KK, FERREL RE: *Genetic of human apolipoprotein: XII. Populations genetics of apolipoproteins in Papua New Guinea*. Am J Hum Biol 1990; 2:17-23.
25. CORBO RM, SCACCHI R, MUREDDU L, MULAS G, ALFARO G: *Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of others European populations*. Am J Hum Genet 1995; 59:197-209.
26. HALLMAN DM, BOERWINKLE E, SAHA N, SANDHOLZEC, MENZEL IJ, CZASAR A, ET AL: *The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of alleles frequencies and effects in nine populations*. Am J Hum Genet 1991; 49:338-349.
27. CREWS DE, KAMBOH MI, MANCILLA-CARVALHO JJ, KOTTKE B: *Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and II polymorphisms in Yanomami Indians of Northwestern of Brazil: association with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism*. Hum Biol 1993; 65:211-224.
28. HAFENER SM, STERN MP, MIETTINEN H, ROBBINS D, HOWARD BV: *Apolipoprotein E polymorphism and LDL size in a biethnic population*. Arteriosclerosis, Thromb Vascular Biol 1996; 16:1184-1188.
29. MAHLEY RW, INNERARITY TL: *Lipoprotein receptor and cholesterol homeostasis*. Biochim Biophys Acta 1983; 737:197-222.
30. MAHLEY RW, ANGELIN B: *Type III hyperlipoproteinemia recent insights into the genetic defect of familial dysbetalipoproteinemia*. Adv Intern Med 1984; 29:385-411.
31. SING CF, DAVIGNON J: *Role of apolipoproteins E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation*. Am J Hum Genet 1985; 37:268-285.
32. EIINHOLM C, LUKKA M, KUSS T, NIKKILA E, YERMANN G: *Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: Genes frequencies and relation to lipoprotein concentrations*. J Lipid Res 1986; 27:227-235.
33. DAVIGNON J, GREGG RE, SING CF: *Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis*. Arteriosclerosis 1988; 8:1-20.
34. BOERWINKLE E, UTERMANN G: *Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B and cholesterol metabolism*. Am J Hum Genet 1988; 42:102-122.
35. WILSON PWT, SCHAEFFER EJ, LARSON MG, ORDovas JM: *Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16:1250-1255.
36. KESANIEMI YA, EIINHOLM C, MIETTINEN TA: *Cholesterol absorption and synthesis related to low density lipoprotein metabolism during varying cholesterol intake in men with different apo E phenotypes*. J Lipid Res 1992; 33:1361-1371.

37. MIETTINEN TA, GYLLING H, VANHANEN H, OLLAS A: *Cholesterol absorption elimination and synthesis related to LDL kinetics during varying fat intake in men with different apolipoprotein E phenotypes*. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:1044-1052.
38. GYLLING H, MIETTINEN TA: *Cholesterol absorption and synthesis related to low density lipoprotein metabolism during varying cholesterol intake in men with different apo E phenotypes*. *J Lipid Res* 1992; 33:1361-1371.
39. WIENITRAUD MS, EISENBERG S, BRESLOW JL: *Different patterns of postprandial metabolism in normal and type IIa, type III and type IV hyperlipoproteinemics. Effects of treatment with cholestyramine and gemfibrozil*. *J Clin Invest* 1987; 79:1110-1119.
40. MIETTINEN TA, GYLLING H, VANHANEN H: *Serum cholesterol and apolipoprotein E phenotype*. *Lancet* 1988; 2:1261.
41. TIKKANEN MJ, HUTENEN JK, EINHOLM C, PIETINEN P: *Apolipoprotein E4 homozygosity predisposes to serum cholesterol elevation during high-fat diet*. *Arteriosclerosis* 1990; 10:285-288.
42. CLIFTON PM, KESTIN M, ABBEY M, DRESDALE M, NESTEL PJ: *Relationship between sensitivity to dietary fat and dietary cholesterol*. *Arteriosclerosis* 1990; 10:394-401.
43. SAVOLAINEN MJ, RANTALA M, KIVINEN J, JARVI L, SUVANTO K, RANTALA T, ET AL: *Magnitude of dietary effects on plasma cholesterol concentration: Role of sex and apolipoprotein E phenotype*. *Atherosclerosis* 1991; 86:145-152.
44. GLATZ JFC, DEMACKER PNM, TURNER PR, KAIJAN MB: *Response of serum cholesterol to dietary cholesterol in relation to apolipoprotein E phenotype*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1991; 1:13-17.
45. GORDON DJ, REKIND BM: *High density lipoprotein: The clinical implications of recent studies*. *N Engl J Med* 1989; 321:1311-1315.
46. BROWN MS, GOLDSTEIN JL: *Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for the cholesterol deposition in atherosclerosis*. *Annu Review Biochem* 1983; 52:223-261.
47. TALL AR: *Plasma high density lipoprotein. Metabolism and relationship to atherosclerosis*. *J Clin Invest* 1990; 86:379-384.
48. FIELDING CJ, HAVEL RJ, TODD KM, YEO KE, SCHLOFFER MC, WEINBERG V, ET AL: *Effects of dietary cholesterol and fat saturation on plasma lipoprotein in a ethnically diverse population of healthy young men*. *J Clin Invest* 1995; 95:611-618.
49. PATSCH W, OSTLUND R, KURSK Y, LEVY R, SCHONFELD G: *Characterization of lipoprotein in a kindred with familial hypercholesterolemia*. *J Lipid Res* 1982; 23:1190-1205.
50. PARTHASARATHY S, KUROJ JC, MILLER E, BARNETT J, WILTZUM JL, STEINBERG D: *Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: Implication for a dietary prevention of atherosclerosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3894-3898.
51. LUC G, BARD J, ARVEILER D, EVANS A, CAMBOU J, BINGHAM A: *Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction: the ECTIM study*. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1412-1419.
52. WILSON PWF, MYERS RH, LARSON MG, ORDOVAS JM, WOLF PA, SCHAEFER EJ: *Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease*. *JAMA* 1994; 272:1666-1671.
53. STEGARD JH, ZERBA KE, PEKKANEN J, EINHOLM C, NISSINEN A, SING CF: *Apolipoprotein E polymorphism predicts death coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men*. *Circulation* 1995; 91:265-269.
54. ORDOVAS JM, LIWACK-KLEIN L, WILSON PWF, SCHAEFER EJ: *Apolipoprotein E isoform phenotyping methodology population frequency with identification of Apo E1 and Apo E5 isoforms in the Framingham offspring study*. *J Lipid Res* 1987; 28:371-380.
55. CUMMING AM, ROBERTSON F: *Polymorphism at the apo E locus and the relation to risk of coronary disease*. *Clin Genet* 1984; 25:310-313.
56. LENZEN HJ, ASSMANN G, BUCHTALSKY R, SCHULTE H: *Association of apolipoprotein E polymorphism, low-density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease*. *Clin Chem* 1986; 32:778-781.
57. ETO M, WATANABE K, MAKINO Y: *Increased frequencies of apolipoprotein E2 and E3 alleles in patients with ischemic heart disease*. *Clin Genet* 1989; 35:186-188.
58. YAMAMURA T, TAJIMA S, MIYAKE Y, NOMURA S, YAMAMOTO A, HAZE K, ET AL: *Hyperlipoproteinemia as a risk factor for ischemic heart disease*. *Jpn Circ J* 1990; 54:448-456.
59. EICHNER JE, KULLER LH, ORCHARD TJ, GRANDTIS GA, MCCALLUM LM, FERREL RE, ET AL: *Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease*. *Am J Cardiol* 1993; 71:160-165.
60. UTERMANN G, HARDEWIG A, ZIMMER F: *Apolipoprotein E phenotypes in patients with myocardial infarction*. *Hum Genet* 1984; 65:237-241.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Apolipoprotein E Polymorphism in the Indian and Mestizo Populations of Mexico

RICARDO GAMBOA,¹ GUADALUPE HERNANDEZ-PACHECO,¹ RAMIRO HESQUIO,¹ JOAQUÍN ZUÑIGA,² FELIPE MASSÓ,¹ LUIS FELIPE MONTAÑO,¹ MANUEL RAMOS-KURI,³ JAVIER ESTRADA,³ JULIO GRANADOS,² AND GILBERTO VARGAS-ALARCÓN^{2,3}

Abstract Apolipoprotein E (APOE) genotypes were determined in 75 Mazatecan Indians and 83 Mexican mestizos. APOE allele and genotype frequencies in Mazatecans and mestizos were similar, with high frequencies of the APOE*3 allele (0.900 and 0.915, respectively) and the E3/3 genotype (0.813 and 0.831, respectively) and an absence in both samples of the APOE*2 allele. Our data are similar to those previously described for Mexican-American and Mayan populations, which show the highest frequency worldwide of the APOE*3 allele and the E3/3 genotype. Mazatecans and mestizos also show a decreased frequency of the APOE*4 allele when compared to other Amerindian groups. The absence of the APOE*2 allele has also been reported in other Amerindian groups such as Mayans and Cayapa, whereas in Caucasians the average frequency of this allele is about 8%. Our data are in agreement with previous reports showing absence of the APOE*2 allele in Native American groups. These findings suggest that the APOE*2 allele was absent in humans from northern Asia who settled in the Arctic and populated the American continent.

The genetic variation at the APOE locus in human populations is an important determinant of plasma lipid levels and relative risk for atherosclerosis. On average, individuals with genotypes E4/4 or 4/3 have higher total serum and LDL-cholesterol concentrations (Dallongeville et al. 1992), than those with APOE 3/3, 3/2, or 2/2 genotypes (Ehnholm et al. 1986). Several studies have shown that individuals with APOE*4 allele are at high risk for developing

¹ Department of Cellular Biology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, Tlalpan 14080, México D.F., México.

² Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000, México D.F., México.

³ Department of Molecular Biology, School of Medicine, Universidad Panamericana, México D.F., México.

Human Biology, December 2000, v. 72, no. 6, pp. 975-981.
Copyright © 2000 Wayne State University Press, Detroit, Michigan 48201-1309

KEY WORDS: GENETIC SUSCEPTIBILITY, CORONARY HEART DISEASE, MAZATECAN INDIANS, MEXICAN MESTIZOS

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

coronary heart disease (CHD) (Tiret et al. 1994) and Alzheimer's disease (Poirier et al. 1993). The latter data suggest an important relationship between *APOE* alleles and the genetic susceptibility to develop cardiovascular disease. In order to prove this relationship, it is important to know the distribution of these alleles in different populations. In an effort to define genetic admixture in Mexican mestizos, this ethnic group has been characterized by using genetic markers from several chromosomes. Results from these studies have shown a proportion of 56% Indian genes, 40% Caucasian genes, and 4% black genes (Lisker et al. 1990). The aim of the present work was to study the distribution of *APOE* alleles in the Mexican population.

Materials and Methods

A panel of 83 unrelated Mexican mestizo individuals living in Mexico City were studied (40 men and 43 women, 20 to 50 years of age). None of these individuals was known to suffer any disease. Individuals were asked about their birthplace as well as that of their parents and maternal and paternal grandparents. We considered as Mexican mestizos only those who for two generations, including their own, had been born in Mexico. A Mexican mestizo is defined as someone born in Mexico who is a descendant of the original autochthonous inhabitants of the region and of individuals, mainly Spaniards of Caucasian and/or black origin, who came to America during the 16th century.

For comparison, a sample of 75 unrelated individuals (35 men and 40 women, 17 to 60 years of age) from the Mazatecan ethnic group, living in Huautla de Jimenez and San Mateo Yoloxochitl villages in the Mexican state of Oaxaca, was included in the study. Individuals were asked about their birthplace as well as that of their parents and maternal and paternal grandparents. The Mazatecans, who inhabit the north of Oaxaca and some areas of the state of Veracruz, are linguistically classified within the Olmeca-Otomangue group, Otomiano-Mixteco subgroup, and Popoloca family (Swadesh 1959). Currently, there are 100,000 individuals who belong to this ethnic group; 66.25% are bilingual and 33.75% are monolingual (data obtained from the Instituto Nacional Indigenista, México).

In order to obtain the sequence that includes the two polymorphic sites (112 and 158 residues), primers F4: 5'-ACAGAATTCGCCCGGGCC TGGTACAC-3' and F6: 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3' (described by Emi et al. 1988) were used to amplify genomic DNA by using polymerase chain reaction (PCR). PCR-amplified products were cleaved with *HhaI* (GIBCO-BRL), using 1 unit of enzyme for 17 μ L of the amplified product and were incubated for 3 hours at 37°C. The fragments obtained were detected by electrophoresis in an 8% polyacrylamide nondenaturing gel and stained with ethidium bromide.

Table 1. Distribution of *APOE* Allele and Genotype Frequencies in the Mazatecan and Mexican Mestizo Populations

<i>APOE</i> Allele	Mazatecan (n = 75)		Mexican Mestizo (n = 83)	
	n	Allele Frequency	n	Allele Frequency
*2	0	0.000	0	0.000
*3	135	0.900	152	0.915
*4	15	0.100	14	0.084
<i>APOE</i> Genotype	n	Genotype Frequency	n	Genotype Frequency
<i>E3/3</i>	61	0.813	69	0.831
<i>E4/3</i>	13	0.173	14	0.168
<i>E4/4</i>	1	0.013	0	0.000

Note: Allele and genotype frequencies of *APOE* variants were obtained by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the Arlequin software program.

Results and Discussion

The distribution of *APOE* allele and genotype frequencies is shown in Table 1. In both samples the observed and expected frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium. Only two alleles, *APOE**3 and *APOE**4, were detected in both samples. For Mazatecans the frequency of *APOE**3 was 0.900 and of *APOE**4 it was 0.100; for Mexican mestizos the frequency of *APOE**3 was 0.915 and of *APOE**4 it was 0.084. Genotype *E3/3* was the one found most frequently in both samples studied, with frequencies of 0.813 and 0.831 in Mazatecans and mestizos, respectively. Frequencies of the other genotypes were *E4/3* = 0.173 and *E4/4* = 0.013 in Mazatecans, and *E4/3* = 0.168 in Mexican mestizos. The two samples thus bear similar frequencies, except for the *E4/4* genotype, which is absent in Mexican mestizos.

APOE allele frequencies in Mazatecans and Mexican mestizos show important differences when compared to those reported in other populations, but not when compared to the Mexican-American population (Table 2). The *APOE**2 allele is absent in both Mexican samples, as it is in other Indian ethnic groups such as Mayans, Yanomami, and Cayapa. This difference is statistically significant when comparing Mexican mestizos or Mazatecans to a Caucasian population ($p < 0.05$). Mazatecans and Mexican mestizos, together with Mayans and Mexican-Americans, are the populations with the highest frequency of allele *APOE**3 (>90%). Statistical analysis showed an increased frequency of this allele in both Mazatecan and Mexican mestizos when compared to Cayapa, Nuuk, Ammassalik, and Caucasian populations ($p < 0.05$). On the other hand, allele *APOE**4 showed a decreased frequency in Mazatecans and Mexican mestizos when compared to that in Cayapa and Ammassalik populations ($p < 0.05$).

Table 2. APOE Allele Frequencies in Various Populations Including the Mazatecan and the Mexican Mestizo

Population	Allele Frequencies				Reference
	n	*2	*3	*4	
Mazatecans (Mexico)	75	0.0 ^a	0.900 ^b	0.100 ^c	Present study
Mestizos (Mexico)	83	0.0 ^a	0.915 ^b	0.084 ^c	Present study
Mayans (Mexico)	135	0.0	0.911	0.089	Kamboh et al. 1991
Mexican-Americans (USA)	210	0.023	0.904	0.071	Haffner et al. 1996
Caucasians (USA)	117	0.140	0.740	0.120	Breslow et al. 1982
Yanomami (Brazil)	96	0.0	0.843	0.156	Crews et al. 1993
Cayapa (Ecuador)	91	0.0	0.720	0.280	Scacchi et al. 1997
Nuuk (Greenland)	100	0.025	0.790	0.185	Gerdes et al. 1996
Ammassalik (Greenland)	78	0.0	0.769	0.231	Gerdes et al. 1996

Note: The distributions of allele frequencies obtained in our populations (Mazatecan Indians and Mexican mestizos) were compared to those previously described in other populations (Caucasian, American Indians, and Greenland groups) using the chi-square test; the *p*-values were corrected for the number of comparisons performed (*p*C).

- a. Decreased frequency when compared to Caucasian population (*p*C<0.05).
 b. Increased frequency when compared to Cayapa, Nuuk, Ammassalik, and Caucasian populations (*p*C<0.05).
 c. Decreased frequency when compared to Cayapa and Ammassalik populations (*p*C<0.05).

In several populations, polymorphism in the APOE genotype is associated with an increase in cardiovascular risk and in serum lipid and lipoprotein values. Thus, the APOE*4 allele is associated with increased levels of total cholesterol and betalipoprotein (Boerwinkle et al. 1989), whereas most patients with type III hyperlipoproteinemia are E2 homozygous (Breslow et al. 1982). These associations are well known in Caucasian populations in which high frequencies of E2 and E4 variants associated with the disease are shown (Mastana et al. 1998). Data on these variants in other populations such as Indians and mestizos are unknown.

Results of the present study show that the two Mexican populations have similar allele and genotype frequency distributions, with high frequencies of the APOE*3 and E3/3 genotype (Table 1). However, they show important differences when compared to other populations, mainly with those of Caucasian origin (Table 2).

In 1984, Dr. Craig Hanis and his colleagues defined a constellation of metabolic disorders in Mexican-Americans, which they described as the New World Syndrome (Weiss et al. 1984). This syndrome includes central obesity, diabetes mellitus, disordered bile acid metabolism, cholesterol gall stones, and gall bladder carcinoma. The risk for developing New World Syndrome appears to be directly related to the percentage of Amerindian genes carried by the individual. However, the risk for developing cardiovascular disease,

including atherosclerosis, is lower in Mexican-Americans, in spite of data that show serum triglyceride concentrations to be slightly higher in this population than in Caucasians at any age (Mitchell et al. 1990). These data have led some investigators to postulate that Mexican-Americans may be relatively protected against developing cardiovascular diseases due to their genetic background. The important relationship between the APOE polymorphism and plasma lipid levels and LDL-cholesterol concentrations suggests that this gene could be part of the genetic background conferring protection to Mexican populations.

Our data, which are similar to those previously described in Mexican-American populations (Haffner et al. 1996), agree with this hypothesis. When compared to Caucasian populations, Mexican Indians and mestizos show a decreased frequency of APOE*2 and APOE*4, two variants that have been associated with atherosclerosis and hyperlipidemia, and consequent risk of developing CHD, in Caucasian populations (Tiret et al. 1994; Breslow et al. 1982). The frequency of the APOE*4 variant in Mexican populations is among the lowest, next only to that in Asian populations (Hallman et al. 1991), a frequency that may be correlated with a less frequent occurrence of cardiovascular disease in these populations as compared to that in Europeans (Utermann 1987). The Chinese and Japanese, two populations with low rates of CHD, have been shown to have the lowest frequency of APOE*4 (Hallman et al. 1991). Conversely, the Finns have a high frequency of this allele, leading to speculation that APOE*4 contributes to the increased prevalence of CHD in this population (Sing et al. 1989). This allele is also frequent in other populations such as sub-Saharan Africans and Aborigines from Oceania; however, the prevalence of CHD in these populations is unknown.

Our data are in agreement with previous reports (Crews et al. 1993) showing an absence of APOE*2 in Native American groups, which suggests that APOE*2 was absent in humans from northern Asia who settled in the Arctic and populated the Americas (Cavalli-Sforza et al. 1994). The low frequency of the APOE*4 allele, together with the absence of the APOE*2 allele in the Amerindian populations, could be part of the genetic background that conferred protection to these populations against developing cardiovascular disease. Additional studies attempting to correlate APOE polymorphism with plasma lipid profiles in a large number of individuals would be helpful in establishing the true significance of this polymorphism in the Mexican population.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the collaboration of the Mazatecan community. This work was partially supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Fundación Mexicana para la Salud, México. We thank Astrid Cruz Semidey for her proofreading and valuable comments on mechanics in the writing of this manuscript.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Received 16 March 1999; revision received 1 March 2000.

Literature Cited

- Boerwinkle, E., S. Visvikis, D. Welsh et al. 1989. The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. II. The role of the apolipoprotein E polymorphism in determining levels, variability, and covariability of cholesterol, beta-lipoprotein, and triglycerides in a sample of unrelated individuals. *Am. J. Med. Genet.* 27:567-582.
- Breslow, J.L., V.J. Zannis, T.R. San Giacomo et al. 1982. Studies of familial type III hypertriglyceridemia using as a genetic marker the apoE phenotype E2/2. *J. Lipid Res.* 23:1224-1235.
- Cavalli-Sforza, L.L., P. Menozzi, and A. Piazza. 1994. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton, NJ: Princeton University Press, 321-325.
- Crews, D.E., M.I. Kamboh, J.J. Mancilha-Carvalho et al. 1993. Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and II polymorphisms in Yanomami Indians of northwestern Brazil: Association with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism. *Human Biol.* 65:211-224.
- Dallongeville, J., S. Lussier-Cacan, and J. Davignon. 1992. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: A meta-analysis. *J. Lipid Res.* 240:447-454.
- Ehnholm, C., M. Lukka, T. Kuusi et al. 1986. Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: Gene frequencies and relations to lipoprotein concentrations. *J. Lipid Res.* 27:227-235.
- Emi, M., L.L. Wu, M.A. Robertson et al. 1988. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 3:373-379.
- Gerdes, L.U., C. Gerdes, P.S. Hansen et al. 1996. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Hum. Genet.* 98:546-550.
- Haffner, R.W., M.P. Stern, H. Miettinen et al. 1996. Apolipoprotein E polymorphism and LDL size in a biethnic population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:1184-1188.
- Hallman, D.M., E. Boerwinkle, N. Saha et al. 1991. The apolipoprotein E polymorphism: A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am. J. Hum. Genet.* 49:338-349.
- Kamboh, M.I., K.M. Weiss, and M.E. Ferrel. 1991. Genetics studies of human apolipoprotein: XVI APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan peninsula, México. *Clin. Genet.* 29:26-32.
- Lisker, R., E. Ramirez, R. Pérez-Briceño et al. 1990. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centers. *Hum. Biol.* 62:791-801.
- Mastana, S.S., R. Calderon, J. Peña et al. 1998. Anthropology of the apolipoprotein E (apo E) gene: Low frequency of apo E4 allele in Basques and in tribal (Baigia) populations of India. *Ann. Hum. Biol.* 25:137-142.
- Mitchell, B.D., M.P. Stern, S.M. Haffner et al. 1990. Risk factors for cardiovascular mortality in Mexican-Americans and non-Hispanic whites. The San Antonio Heart Study. *Am. J. Epidemiol.* 131:423-433.
- Poirier, J., J. Davignon, D. Bouthillier et al. 1993. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342:697-699.
- Scacchi, R., R.M. Corbo, O. Rickards et al. 1997. Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador. *Hum. Biol.* 69:375-382.
- Sing, C.F., and P.P. Moll. 1989. Genetics of variability of CHD risk. *Int. J. Epidemiol.* 18 (Suppl 1):S183-S195.
- Swadesh, M. 1959. *Indian Linguistic Groups of Mexico*. Escuela Nacional de Antropología e Historia, México.

- Tiret, L., P. De Knijff, H.J. Menzel et al. 1994. Apo E polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS study. European Atherosclerosis Research Study. *Arterioscler. Thromb.* 14:1617-1624.
- Utermann, G. 1987. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am. Heart J.* 113:433-440.
- Weiss, K.M., R.E. Ferrell, and C.L. Hanis. 1984. A New World syndrome of metabolic diseases with a genetic and evolutionary basis. *Yearbook Phys. Anthropol.* 27:153-178.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Avshaev, G.O. 1994. *The origin of the Kalmyk people (middle of IX- first quarter of XVIII centuries)*. Ph.D. thesis, Moscow, Elvita (in Russian).
- Batsuur, Zh., N. Saubunghin, Y.V. Shneider et al. 1991. Genetic structure of Mongols as shown by the data on ABO, Hp, Gc, C3, G6PD, GLD1, ESD, PGM1, ACP, 6-PGD loci. *Genetica* 27(2): 316-326.
- Bembeev, V.Sh., K.P. Shonmov, U.E. Erdeniev et al. 1987. *History of Kalmykia from Ancient Times to the XX century* (in Russian).
- Cheboksarov, N.N. 1935. *The Kalmyks of the Western Ulas*. Anthropological Magazine, #1, Moscow (in Russian).
- Crawford, M.H., D. Demarchi, M. Hillel et al. 2000. Body morphology and aging among the Mennonites of Kansas and Nebraska. In *Differential Seasons. Biological Aging among the Mennonites of Midwestern United States*. University of Kansas Publications in Anthropology, 21, Lawrence, KS, pp. 55-67.
- Crawford, M.H., J. McComb, M.S. Schanfield et al. 2001. Genetic structure of pastoral populations of Siberia: The Evenki of Central Siberia and the Kizhi of Gorno Altai. In *The Last of the Pastoralists: Biosultural Dimensions*, W. Leonard and M.H. Crawford, eds. Cambridge, UK: Cambridge University Press (in press).
- Devision, I. 1988. *Multidimensional Scaling*. Moscow: Finance and Statistics (in Russian).
- Divall, G.B. 1984. The FSD polymorphism as revealed by IEF in ultra-thin polyacrylamide gels. *Tetrahedron Lett* 26: 255-267.
- Erdeniev, U.E. 1985. *Kalmyks*. Moscow: Nauka (in Russian).
- Goedde, H.-W., H. G. Benkman, and I. Huth. 1981. Ultrathin-layer isoelectric focusing of subtypes of Gc, Tf, Pi and PGM1. In *Humanochemical Evidence of Paternity*, K. Hummel and J. Gerchow, eds. Berlin: Springer-Verlag, pp. 123-126.
- Gorz, A., J. Weter, R. Westermeier et al. 1983. IEF with immobilized pH gradients for the analysis of Tf subtypes and variants. *Hum. Genet.* 64:222-226.
- Hughes, J.P. 1962. *The Science of Language: An Introduction to Linguistics*. New York, NY: Random House.
- Katzner, K. 1986. *The Languages of the World*. London, UK: Routledge and Kegan Paul.
- Miller, S.A., M.S. Neelson, D.D. Dykes et al. 1987. Comparison of acid phosphatase ACP1 variants by H-F and conventional electrophoresis: Identification of three new alleles, ACP*^N, ACP1*^P, and ACP1*^S. *Human Heredity* 37:371-375.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Natur.* 106:283-292.
- Novorodovskiy, A.G., V.A. Spitsyn, R. Duggirala et al. 1993. Population genetics and structure of Byzants from the Lake Baikal region of Siberia. *Hum. Biol.* 65:689-709.
- Rychkov, Yu.G., V.A. Spitsyn, Yu.V. Shneider et al. 1984. Genetics of some populations of hunter-reindeer from taiga of Middle Siberia. Biochemical gene markers. *Genetika* 20:1701-1706 (in Russian).
- Spitsyn, V.A. 1985. *Human Biochemical Polymorphism*. Moscow: Moscow State University Press (in Russian).
- Spitsyn, V.A., I.S. Atanac'eva, R.K. Agapova et al. 1994. The study of genetic markers of Russians and Germans within the framework of a joint research project. *Genetika* 30: 702-708 (in Russian).
- Spitsyn, V.A., and N.V. Titenko. 1990. Normal group-specific component (Ge) subtypes and those in some diseases. *Genetika* 26:749-759 (in Russian).
- Sukernik, R.I., S.V. Icmza, T.M. Karaphet et al. 1981. Reindeer Chukchi and Siberian Eskimos: Studies of blood groups, serum proteins, and red cell enzymes with regard to genetic heterogeneity. *Am. J. Phys. Anthropol.* 55:121-128.
- Terehina, A.J. 1986. *The Analysis of Data by Method of Multidimensional Scaling*. Moscow: Nauka (in Russian).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Influence of the Apolipoprotein E Polymorphism on Plasma Lipoproteins in a Mexican Population

RICARDO GAMBOA,^{1,2} GILBERTO VARGAS-ALARCÓN,^{1,2} AIDA MEDINA-URRUTIA,² GUILLERMO CARDOSO-SALDAÑA,² GUADALUPE HERNÁNDEZ-PACHECO,² JOSÉ ZAMORA-GONZÁLEZ,² AND CARLOS POSADAS-ROMERO²

Abstract The influence of apolipoprotein E (*APOE*) genotypes on plasma lipid levels was determined in 278 Mexican individuals. The most frequent genotype was *E3/3* (80.5%) followed by *E3/4* (12.5%), *E2/3* (5.0%), *E2/4* (1.4%), and *E4/4* (0.3%). Our data are similar to those previously described for Mexican-American and American Indian populations, which show the highest frequency worldwide of the *APOE*3* and the *E3/3* genotype. Compared to female carriers of the *E3/3* genotype, women with the *E3/4* genotype presented increased low-density lipoprotein cholesterol (117 ± 28.0 mg/dL vs. 134.0 ± 31.7 mg/dL, $p < 0.05$), and total cholesterol (179.4 ± 33.4 mg/dL vs. 197.5 ± 35.4 mg/dL, $p < 0.01$). Also, we detected increased high-density lipoprotein concentrations in women with the *E2/3* genotype (53.7 ± 19.5 mg/dL) when compared to women with the *E3/3* genotype (45.2 ± 12.0 mg/dL) ($p < 0.032$). Our data suggest that genetic variation at the *APOE* locus in the Mexican population is a genetic factor that influences plasma lipid levels. This effect was observed only in the female population. Additional studies attempting to correlate *APOE* polymorphism with plasma lipid profile in a large number of individuals would be helpful in establishing the true significance of this polymorphism in the Mexican population.

Apolipoprotein E (*APOE*, protein; *APOE*, gene) is a normal constituent of very low-density lipoprotein (VLDL) and high-density lipoprotein (HDL) (Mahaley et al. 1988). The encoding gene for *APOE* has three common alleles (Rall et al. 1982), *APOE*2*, *APOE*3*, and *APOE*4*. These alleles, inherited codominantly, give rise to six common genotypes (*APOE 2/2*, *3/3*, *4/4*, *2/3*, *2/4*, and *3/4*) (Utermann et al. 1977). Studies in several populations have shown that *APOE* allele distribution can differ among groups (Mastana et al. 1998), and that the polymorphism may have an important effect on plasma lipid levels in these populations (Dart et al. 1997). Isoforms of *APOE* and related genotypes differ in terms of their

¹The contribution by Ricardo Gamboa and Gilberto Vargas-Alarcón is equal and the order of authorship is arbitrary.

²Physiology and Endocrinology Departments, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," México, D.F., México

Human Biology, December 2001, v. 71, no. 6, pp. 835-843.
Copyright © 2001 Wayne State University Press, Detroit, Michigan 48201-1409

KEY WORDS: APOLIPOPROTEIN E, POLYMORPHISM, MEXICO, ALLELES, GENOTYPE

influence on cell surface receptor (*APOE* and *APOB/E* receptors) binding and catabolism of *APOB*-containing lipoproteins and intestinal absorption of dietary cholesterol, mechanisms that likely govern variations in serum lipoprotein concentrations (Lanson et al. 2000). In the population at large, irrespective of genetic background and environment, the *APOE**2 allele is associated with lower and the *APOE**4 allele with higher total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, and *APOB* levels than is the *APOE**3 allele (Boer et al. 1997). Further, both *APOE**2 and *APOE**4 alleles are found to be associated with high triglyceride levels in some but not all studies (Dallongeville et al. 1992; Boudreau et al. 1999). As much as 16% of the genetic variance of LDL cholesterol (8% of total variance) can be accounted for by the *APOE* locus, a contribution unsurpassed by any other gene in the general population (Lanson et al. 2000).

*APOE**3 is the most common *APOE* allele with a phenotype prevalence of 67% to 87% (Mastana et al. 1998). The *APOE**4 allele frequency is about 14% in US non-Hispanic Caucasians and 10% in US Hispanics, but it is considerably higher in African Americans (25%) (Mastana et al. 1998). In Caucasians, the *APOE**2 allele is observed in 8% to 11% of the population; in North American Indians it is present in 1.6%; and in Meso and South American Amerindians, such as Mayans (Kamboli et al. 1991), M'atatecans (Gambao et al. 2000), Yanomami (Crews et al. 1993), and Cayapa (Scacchi et al. 1997), it is completely absent.

Because of the significant impact of the *APOE* polymorphism on lipoprotein lipid levels and its heterogeneous distribution among populations, this study sought to determine gene frequencies for *APOE* alleles and their possible effect on the lipid profile in a sample of Mexico City's population.

Materials and Methods

Study Subjects. Samples were obtained from the personnel of public and private schools in Mexico City. A total of 278 individuals (200 women and 78 men) who agreed to participate in the study were included for analysis. Venous blood was collected after subjects had fasted overnight and had been in a sitting position for 15 to 20 min. Height, weight, waist, and hip circumferences were measured, and body mass index (weight in kilograms divided by height in meters squared) was calculated.

Laboratory Analysis. Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were analyzed by enzymatic methods (Roche-Syntex/Boehringer Mannheim). High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was measured after precipitation of low- and very low density lipoproteins by phosphotungstate/Mg²⁺ (Roche-Syntex/Boehringer Mannheim), and LDL cholesterol (LDL-C) and VLDL cholesterol (VLDL-C) were estimated by the equation of Friedewald et al. (1972) modified by De Long (1986). All assays were under an external quality control scheme (Lipid Standardization Program, Centers for Disease Control, Atlanta, GA). Intra-assay coefficients of variation (CV) for TC, TG, and HDL-C were

1.1%, 0.6%, and 1.1%; inter-assay CV for TC, TG, and HDL-C were 3.1%, 2.6%, and 3.9%, respectively.

PCR Amplification. In order to obtain the sequence that includes the two polymorphic sites (112 and 158 residues), the previously described primers,

F4: 5'-ACAGAATTCGCCCGGCTGGTACAC-3' and

R6: 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'.

(Emi et al. 1988), were used to amplify genomic DNA by using the polymerase chain reaction (PCR). PCR amplification was performed on 0.25 µg of genomic DNA using 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 200 µM each dNTP, 2 mM MgCl₂, 1X PCR buffer, and 25 pmoles of each primer in a 25 µL volume. Amplifications were carried out in a Perkin Elmer 9700 thermocycler (Foster City, CA, USA) with 30 cycles of 95°C for 20 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 1.15 min.

Restriction of Amplified Products with *HhaI*. PCR-amplified products were cleaved with *HhaI* (GIBCO-BRL), using 1 unit of enzyme for 17 µL of the amplified product, and were incubated for 3 hours at 37°C. The fragments obtained were electrophoresed in an 8% polyacrylamide nondenaturing gel and visualized by silver staining. The sizes of *HhaI* fragments were estimated by comparison with previously known size markers (*MspI*-digested pUC18 DNA).

Statistical Analysis. Allele and genotype frequencies of *APOE* variants were obtained by direct counting. Also, Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the ARLEQUIN program. The unpaired Student *t* test was used to compare mean values between men and women. Covariance analysis (ANCOVA) was used to evaluate the effect of *APOE* phenotypes on lipid and lipoproteins. Only four subjects had *APOE* 4/2 and only one had 4/4; thus, they were excluded from this analysis. Analysis was carried out separately for females and males; *p* values less than 0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed with SPSS version 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

A total of 78 men and 200 women living in Mexico City were analyzed. Relevant clinical information on the population studied is shown in Table 1. The mean age for men was 39.8 ± 10.4 years and for women was 40.2 ± 9.4 years. Body mass index was 26.8 ± 4.0 kg/m² in men and 25.9 ± 4.0 in women. Diastolic and systolic blood pressure, waist to hip ratio, LDL cholesterol, VLDL cholesterol, and triglycerides were significantly higher in males than in females (*p* < 0.0001). The HDL cholesterol level was significantly lower in males than in fe-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 1. Laboratory and Clinical Parameters of the Study Subjects

	Total Population (n = 278)	Men (n = 78)	Women (n = 200)	p*
Age	40.1 ± 9.64	39.8 ± 10.4	40.2 ± 9.4	ns
BMI	26.2 ± 4.04	26.8 ± 4.0	25.9 ± 4.0	ns
WHR	85.7 ± 11.6	93.8 ± 11.4	82.4 ± 9.9	<0.0001
AverP _{as}	113.9 ± 13.3	120 ± 10.9	111.6 ± 13.5	<0.0001
AverP _{ad}	76.6 ± 9.5	80.3 ± 8.0	75.2 ± 9.6	<0.0001
TC	184.7 ± 36.3	190.2 ± 41.3	182.6 ± 34.0	ns
LDL-C	121.9 ± 30.6	127 ± 33.5	119 ± 29.2	<0.05
TG	118.2 ± 72.5	143 ± 87.7	108 ± 63.3	<0.0001
VLDL-C	18.9 ± 11.6	22.9 ± 14.0	17.3 ± 10.1	<0.0001
HDL-C	44.02 ± 12.22	39.5 ± 10.6	45.8 ± 12.4	<0.0001
Glucose	90.0 ± 11.5	93.1 ± 19.7	88.8 ± 35.05	ns

BMI: body mass index; WHR: waist-to-hip ratio; AverP_{as}: average pressure systolic; AverP_{ad}: average pressure diastolic; TC: total cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides; VLDL-C: very low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol.

*Unpaired Student *t* test.

males. Of the subjects, 17% had hypertension, 4.3% had diabetes, and 1.1% had myocardial infarct.

APOE allele frequency distribution data for this study and comparison with that reported previously in other populations are shown in Table 2. APOE*2, APOE*3, and APOE*4 frequencies were 3.2%, 89.3%, and 7.3%, respectively; there were no differences between men and women (data not shown). The most

Table 2. APOE Allele Frequencies in Various Populations

Population	n	Reference	Allele Frequency %		
			APOE*2	APOE*3	APOE*4
Mexicans	278	This study	3.2	89.3	7.3
Mexicans	83	Gambosa 2000	0	91.5	8.4
Mazatecos	75	Gambosa 2000	0	90	10
Mayans	135	Kamboli, 1991	0	91.1	8.9
Purépechas	142	Aguilar 1999	2.5	79.7	17.7
Mexican-Americans	210	Haffner 1996	2.3	90.4	7.1
Yanomami	96	Crews 1993	0	84.3	15.6
Cayapas	91	Scacchi 1997	0	72	28
Nink	100	Genes 1996	2.5	79	18.5
Caucasians	117	Mastana 1998	14	74	12
Spanish	226	Genie 1997	6.4	81	12.6
Japanese	333	Hallman 1991	4.2	86.3	9.4

frequent genotype was APOE*3 (80.5%), followed by E3/4 (12.5%), E2/3 (5.0%), E2/4 (1.4%), and E4/4 (0.3%). All populations showed a high APOE*3 allele frequency; however, our population, together with other previously reported Mexican populations, showed the highest frequency for this allele. We detected a low APOE*2 frequency in our population (3.2%), which is comparable with data reported on other Mexican populations. Finally, APOE*4 frequency is the lowest reported thus far, comparable only with frequencies for this allele in Asian populations.

The impact on the lipid profile of the APOE genotype on the total group is shown in Table 3. After adjustments for age, sex, and BMI, there were no significant differences between E2/3 and E3/4 genotypes when compared to the E3/3 genotype. This analysis was carried out separately for women and men, but as a result of the low number of male subjects with genotypes different than E3/3, we show only the data on women (Table 3). In this case, we detected increased HDL concentrations in women with E2/3 genotype (53.7 ± 19.5 mg/dL) when compared to women with E3/3 genotype (45.2 ± 12.0 mg/dL) ($p < 0.032$). On the other hand, women with the E3/4 genotype had significantly higher LDL cholesterol (134.0 ± 31.7 mg/dL) and total cholesterol (197.5 ± 35.4 mg/dL) levels than women with the E3/3 genotype (117 ± 28.0 mg/dL for LDL cholesterol, $p < 0.05$ and 179.4 ± 33.4 mg/dL for total cholesterol, $p < 0.01$). Also, a moderate increase in LDL cholesterol and total cholesterol was found in women with the E2/3 genotype; however, when compared to women with the E3/3 genotype, the difference was not statistically significant.

Because other genetic and environmental factors modified the influence of the APOE polymorphism on lipid levels, we analyzed this effect in the total group of individuals (women and men), but considered only those subjects with a BMI between 20 and 25 kg/m² (data not shown). In so doing, we observed that carriers of the E3/4 genotype had higher levels of total cholesterol, LDL cholesterol,

Table 3. Lipid Profile according to Phenotype

	Total Population ^a			Women ^b		
	APO-E2/3 (n = 14)	APO-E3/3 (n = 224)	APO-E3/4 (n = 36)	APO-E2/3 (n = 11)	APO-E3/3 (n = 158)	APO-E3/4 (n = 26)
TC	197.05 ± 8.9	183.6 ± 2.3	187.4 ± 5.7	196.3 ± 29.0	179.4 ± 33.4	197.5 ± 35.4**
LDL-C	126.6 ± 7.5	121.1 ± 1.9	126.3 ± 4.8	124.0 ± 31.4	117.0 ± 28.0	134.0 ± 31.7*
TG	132.3 ± 18.2	117.7 ± 4.6	110.8 ± 11.7	117.1 ± 51.4	108.5 ± 67.5	108.0 ± 44.8
HDL-C	49.4 ± 3.1	43.9 ± 0.8	41.4 ± 1.99	53.7 ± 19.5	45.2 ± 12.0*	46.2 ± 11.0

^aANCOVA adjusted by BMI, sex, and age.

^bDue to low number of male subjects with genotype different than E3/3, we show only the female data. Adjusted by BMI and age.

TC: total cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

triglycerides, and VLDL cholesterol, whereas the subjects with the *E2/3* genotype had higher levels of HDL cholesterol. None of these differences was statistically significant.

Discussion

Population Genetics. *APOE* allele frequencies in the present study are similar to those previously reported by our group for the Indian and Mestizo populations of Mexico. However, they show important differences when compared to those reported in other populations, mainly with those of Caucasian origin (Mastana et al. 1998) (Table 2). The absence or low frequency of the *APOE*2* allele has been observed in several American Indian populations previously reported such as Mayans, Mazatecos, Yanomami, Cayapas, Nuuks, and Anmassalik (Kamboh et al. 1991; Gamboa et al. 2000; Crews et al. 1993; Scacchi et al. 1997; Gerdes et al. 1996). This absence or low frequency suggests that *APOE*2* was absent in humans from northern Asia who settled in the Arctic and populated the Americas (Cavalli-Sforza et al. 1994). These data are interesting, for they support the position that this allele is absent in Mexican Indians, and that its 3.2% frequency observed in our study population is the result of a mixture with Caucasian populations, who show a relatively high frequency of this allele (14%) (Davignon et al. 1988). In our Mexican population we found one of the highest frequencies for the *APOE*3* allele (89.3%) and one of the lowest for the *APOE*4* allele (7.3%) compared with other populations, mostly with Caucasians, where high *APOE*4* and low *APOE*3* frequencies are shown (12% and 74%, respectively). This low frequency of *APOE*2* and *APOE*4* and high frequency of *APOE*3* alleles agree with frequencies reported in Mexican Indians such as Mayans and Mazatecos (Kamboh et al. 1991; Gamboa et al. 2000). One Mexican Indian group that showed differences in the *APOE* polymorphism was the Purépechas (Aguilar et al. 1999), who showed a high frequency of *APOE*4* (17.7%) and presence of *APOE*2* (2.5%). The Purépechas live in the state of Michoacán, México, and speak a language unrelated to the other four linguistic trunks described for Mexico (Swadesh 1959).

***APOE* Polymorphism and Cholesterol Levels.** Diverse reports show that a relationship between apolipoprotein E genotype and serum lipid levels exists for several populations, principally Caucasians. For men as well as women, individuals with high *APOE*4* allele frequency tend to present with a high total cholesterol (Clifton et al. 1990; Savolainen et al. 1991), high LDL-C, and high triglyceride levels (Scacchi et al. 1997). Individuals with *APOE*2* present with opposite *APOE*4* levels, that is, decreased LDL-C and total cholesterol levels and increased HDL-C levels (Larson et al. 2000). Several studies suggest that carriers, both men and women, of the *APOE*2* allele have low LDL cholesterol levels, those with the *APOE*3/3* genotype have intermediate levels, and those with the *APOE*4* allele have the highest levels. In our population study an increase of

LDL cholesterol and total cholesterol was detected for women carriers of the *E3/4* genotype. This effect was also observed for the total group, but only when we considered subjects with a BMI between 20 and 25 kg/m². Several reports suggest that the effect of the *APOE* polymorphism on LDL cholesterol concentrations is mediated by the LDL receptor (Utermann et al. 1995). This finding is in accordance with the fact that the *APOE*2* allele presents low affinity to its receptor and is associated with low hepatocyte-contained cholesterol and an LDL receptor overregulation, which causes a plasma LDL clearance and, in consequence, a plasma LDL cholesterol diminishment (Larson et al. 2000). On the other hand, the *APOE*4* allele shows metabolic effects opposite to those of *APOE*2*, for this isoform presents great affinity for triglyceride-rich lipoproteins and induces a quick liver capture. As a consequence, hepatocyte-contained cholesterol increases and LDL receptors diminish, resulting in a plasma LDL cholesterol level increase.

With regard to the relationship between HDL cholesterol and the *APOE*2* allele, the literature reports conflicting results. Whereas several investigators failed to show an association between the *APOE*2* allele and HDL cholesterol levels (Bredie et al. 1996; Munos and Rodríguez-Ferrer 1996), others report increased levels in subjects carrying the *APOE*2* allele (Kamboh et al. 1993). Two previous studies (Hegele et al. 1994; Barter et al. 1990) could detect an association only in the female population, where women carrying the *APOE*2* allele had higher HDL cholesterol levels and those carrying the *APOE*4* allele had lower levels when compared to women with *E3/3* genotype. In our study of a Mexican population the effect of the *APOE* polymorphism on HDL cholesterol levels was noted only in women, but in this case the analysis of men was omitted because of the low number of subjects with *E2/3* and *E3/4* genotypes. A study with a larger number of male subjects could help to define the role of the *APOE* polymorphism on HDL cholesterol levels in this population. Several mechanisms have been proposed in order to explain the relation between the *APOE* polymorphism and HDL cholesterol levels, but this relation remains to be clarified. Recently, reports suggested that *APOE* plays an important role in the regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP), which has a direct effect on the HDL cholesterol concentrations (Martin et al. 1993). Another explanation may be the participation of *APOE* in the extracellular efflux of cholesterol (Haffner et al. 1996), which could vary depending on the *APOE* genotype.

Our data suggest that genetic variation at the *APOE* locus in the Mexican population is a genetic factor that influences the plasma lipid levels. The *APOE*2/3* genotype was related to high levels of HDL cholesterol, whereas the *E3/4* genotype had high levels of LDL and total cholesterol. This effect was observed only in the female population. Additional studies attempting to correlate *APOE* polymorphism with plasma lipid profiles in a large number of individuals would be helpful in establishing the true significance of this polymorphism in the Mexican population.

105

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Received 23 February 2001; revision received 9 July 2001.

Literature Cited

- Aguilar, C.A., G. Talavera, J.M. Orozco et al. 1999. The apolipoprotein E4 allele is not associated with the abnormal lipid profile in a Native American population following its traditional lifestyle. *Atherosclerosis* 142:409-414.
- Barter, P.J., L.B. Chang, H.H. Newnam et al. 1990. The interaction of cholesteryl ester transfer protein and unesterified fatty acids promotes a reduction in the particle size of high density lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 1045:81-89.
- Boer, J.M.A., C. Fahlholm, H. Menzel et al. 1997. Interactions between lifestyle-related factors and the ApoE polymorphism on plasma lipids and apolipoproteins. *Arterioscler. Thromb.* 17:1675-1681.
- Boudreau, D., W. Douglas-Scheer, G.T. Malcolm et al. 1999. Apolipoprotein E and atherosclerosis in Greenland Inuit. *Atherosclerosis* 145:207-219.
- Bredie, S.J., J.M. Vogelstein, P.N. Denacker et al. 1996. Apolipoprotein E polymorphism influences lipid phenotypic expression, but not the low density lipoprotein subfraction distribution in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 126:313-324.
- Cavalli-Sforza, L.L., P. Menozzi, A. Piazza. 1994. *The History and Geography of Human Genes*. Princeton, NJ: Princeton University Press, 321-325.
- Clifton, P.M., M. Kestin, M. Abbey et al. 1990. Relationship between sensitivity to dietary fat and dietary cholesterol. *Arteriosclerosis* 10:394-401.
- Crews, D.E., M.I. Kamboh, J.J. Manclilla-Carvalho et al. 1993. Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and B polymorphisms in Yanomami Indians of Northwestern Brazil: Association with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism. *Hum. Biol.* 65:211-224.
- Dallongeville, J., S. Jussier-Cacan, J. Davignon. 1992. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: A meta-analysis. *J Lipid Res.* 33:447-454.
- Dart, A., B. Sherrard, and H. Simpson. 1997. Influence of apoE phenotype on postprandial triglyceride and glucose responses in subjects with and without coronary heart disease. *Atherosclerosis* 130:161-170.
- Davignon, J., R.E. Gregg, and C.P. Sing. 1988. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 8:1-20.
- De Long, D.A., E.R. De Long, and P.D. Wesel. 1986. The comparison of methods for the estimation of plasma low and very low density lipoproteins cholesterol. *JAMA*, 256:2372-2377.
- Emi, M., I. I. Wu, M.A. Robertson et al. 1988. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 3:373-379.
- Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson. 1972. Estimation of concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma, without of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18:499-502.
- Gamboa, R., G. Hernandez-Pacheco, R. Hesiquio et al. 2000. Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo population of Mexico. *Hum. Biol.* 72:975-981.
- Gene, M., P. Moreno, M. Esquerro et al. 1997. Low apolipoprotein E4 allele frequency in the population of Catalonia (Spain) determined by PCR-RFLP and laser fluorescent sequencer. *Eur. J. Epidemiol.* 13:841-843.
- Gerdes, L.U., C. Gerdes, P.S. Hansen et al. 1996. The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective. *Hum. Genet.* 98:546-550.
- Hallner, S.M., M.P. Stern, H. Miettinen et al. 1996. Apolipoprotein E polymorphism and LDL size in a biethnic population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:1184-1188.
- Hallman, D.M., E. Boerwinkle, N. Saha et al. 1991. The apolipoprotein E polymorphism: A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am. J. Hum. Genet.* 49:338-349.
- Hegele, R.A., A.J. Evans, L. Tu et al. 1994. A gene-gender interaction affecting plasma lipoproteins in a genetic isolate. *Arterioscler. Thromb.* 14:671-678.
- Kamboh, M.I., C.E. Aston, R.E. Ferrell et al. 1993. Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanic and non-Hispanic whites. *Atherosclerosis* 98:201-211.
- Kamboh, M.I., K.M. Weiss, and M.E. Ferrell. 1991. Genetics studies of human apolipoprotein: XVI APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatán peninsula, México. *Chin. Genet.* 29:26-32.
- Larson, J.A., J.M. Orozco, C. DeLuca et al. 2000. Association of apolipoprotein (Apo) E genotype with plasma apo E levels. *Atherosclerosis* 148:327-335.
- Mahaley, R.W. 1988. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240:622-630.
- Martin, L.L., P.W. Connelly, D. Nanos et al. 1993. Cholesteryl ester transfer protein and high density lipoprotein responses to cholesterol feeding in men: Relationship to apolipoprotein E genotype. *J. Lipid Res.* 34:437-446.
- Mastana, S.S., R. Calderon, J. Peña et al. 1998. Antitopology of the apolipoprotein E (apo E) gene: Low frequency of apo E4 allele in Basques and in tribal (Baiga) populations of India. *Ann. Hum. Biol.* 25:137-142.
- Muros, M., and C. Rodriguez-Ferrer. 1996. Apolipoprotein E polymorphism influence on lipid, apolipoproteins and I pta) in a Spanish population underexpressing apo E4. *Atherosclerosis* 121:13-21.
- Rall, S.C., K.H. Weisgraber, and R.W. Mahley. 1982. Human apolipoprotein E: The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 257:4171-4178.
- Savolainen, M.J., M. Rantala, J. Kervinen et al. 1991. Magnitude of dietary effects on plasma cholesterol concentration: Role of sex and apolipoprotein E phenotype. *Atherosclerosis* 86:145-152.
- Scacchi, R., R.M. Curblo, O. Rickards et al. 1997. Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador. *Hum. Biol.* 69:375-382.
- Swadesh, M. 1959. *Indian Languages Groups of Mexico*. Escuela Nacional de Antropología e Historia, México.
- Utermann, G., M. Hess, and A. Steinmetz. 1977. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. *Nature* 269:604-607.
- Utermann, G. 1995. Genetic polymorphism in apolipoprotein E: Impact on plasma lipoprotein metabolism. In *Diabetes, Obesity, and Hyperlipidemia*, III, G. Cepaldi, A. Tiengo, and G. Haggis Jr, eds. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1-28.

TESIS CON
ELLA DE ORIGEN