

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



UNAM IZTACALA



IZTACALA

**POLIMORFISMO DEL GEN DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE ÉSTERES DE
COLESTEROL (CETP), LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS EN POBLACIÓN ABIERTA DEL
SUR DE LA CIUDAD DE MÉXICO.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A
MIGUEL GALICIA JUÁREZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUILLERMO C. CARDOSO SALDAÑA

MÉXICO, D. F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A MIS PADRES:

Luis y Leovigilda Trinidad quienes a lo largo no solo de mi carrera, sino de mi vida, me han apoyado en todo, aun en los momentos más difíciles por los cuales se suele pasar. Les estoy plenamente agradecido por unir y guiar a la familia. Nuevamente gracias mamá y papá, esto es para ustedes.

A MIS HERMANOS:

Lupe y Mario por ayudarme a salir adelante en los momentos difíciles con sus ocurrencias que solamente te dan los hermanos. Los quiero mucho. De igual forma a mi cuñada Sabina, que dio junto con Luis Alberto la felicidad a mi hermano.

A MIS TÍOS:

Beto y Conchita, les estoy agradecido por sus valiosos consejos y cuidados durante el tiempo en que viví con ustedes. Los quiero mucho y los considero como mis segundos padres.

A MI ESPOSA E HIJO:

Jung Mi y Tong Su, quienes con su presencia me dieron la oportunidad de descubrir otro tipo de amor y felicidad, gracias por su paciencia y amor incondicional.

A DIOS:

Por darme la vida, una familia espléndida y la capacidad de dar y recibir amor.

Agradecimientos

Al Dr. Carlos Posadas Romero, gracias por su apoyo que me brindo durante mi estancia en el laboratorio, estoy en deuda con usted.

A Guillermo, por abrirme las puertas de éste laboratorio y guiarme con sus enseñanzas hasta concluir con este trabajo.

A José, una persona quien me ayudó no solo en el ámbito profesional, sino también en lo personal.

A todos los que conforman el Laboratorio de Endocrinología de los que aprendí de cada uno algo.

Al Dr. Gilberto Vargas y Ricardo Gamboa por sus enseñanzas y consejos.

Presidente: M. en C. Elías Piedra Ibarra

Vocal: Dr. Guillermo C. Cardoso Saldaña

Secretario: Dr. Sergio Vaca Pacheco

Suplente: M. en C. Claudia Tzasna Hernández Delgado

Suplente: M. en C. Angel Duran Díaz

Sitio donde se realizó el estudio:

Departamento de Endocrinología
Instituto Nacional de Cardiología
“Ignacio Chávez”

ÍNDICE

IZT.

I. RESUMEN.....	6
II. INTRODUCCIÓN.....	7
1. LIPOPROTEÍNAS.....	7
1.1. Proteínas asociadas a lipoproteínas.....	9
1.2. Enzimas asociadas al metabolismo de lipoproteínas.....	10
1.3. Metabolismo de las lipoproteínas.....	11
a) Vía exógena.....	11
b) Vía endógena.....	13
c) Transporte reverso del colesterol.....	15
2. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Factores de riesgo de enfermedad arterial coronaria.....	17
2.2 Lipoproteínas y aterosclerosis.....	17
2.3 CETP.....	19
2.4 Regulación del gen para CETP.....	21
2.5 CETP y su relación con la hipoalfalipoproteinemia.....	23
III) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
IV) OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	27
V) HIPÓTESIS.....	27
VI) MATERIAL MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO.....	28
1) MUESTRA POBLACIONAL.....	28
2) TIPO DE ESTUDIO.....	28
3) ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	28
a) Extracción de DNA.....	29

b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
c) Verificación de la ampliación.....	30
d) Digestión del producto de la PCR con la enzima <i>Taq1B</i>	31
e) Verificación del genotipo.....	31
VII) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
VIII) RESULTADOS.....	33
IX) DISCUSIÓN.....	40
X) CONCLUSIÓN.....	46
XI) APÉNDICE.....	47
XII) REFERENCIAS.....	53

FIGURAS

1. LIPOPROTEÍNA.....	7
2. VÍA EXÓGENA.....	12
3. VÍA ENDÓGENA.....	14
4. METABOLISMO DE HDL.....	16
5. MECANISMO DE INTERCAMBIO POR CETP.....	21
6. ESTRUCTURA DEL GEN DE CETP.....	25
7. ELECTROFORESIS EN AGAROSA.....	33
8. HIPOALFALIPOPROTEINEMIA POR GENOTIPO.....	37
9. RIESGO DE HIPOALFALIPOPROTEINEMIA POR GENOTIPO.....	39
10. GENOTIPO CETP Y C-HDL EN DIFERENTES POBLACIONES.....	43

TABLAS

1.	CLASIFICACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS.....	8
2.	APOLIPOPTROTÍNAS	9
3.	ENZIMAS DEL METABOLÍSMO DE LIPOPROTEÍNAS.....	10
4.	CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS POR GENOTIPO.....	34
5.	LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS POR GENOTIPO.....	35
6.	LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS POR SEXO.....	36
7.	FACTORES DE RIESGO POR GENOTIPO.....	37
8.	LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS EN MUJERES POR GENOTIPO.....	38
9.	FRECUENCIAS ALÉLICAS.....	41

I) RESUMEN

La proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) transporta ésteres de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a las lipoproteínas de baja (LDL), intermedia (IDL) y muy baja densidad (VLDL). Estudios realizados en diversas poblaciones han encontrado asociación entre polimorfismos de la proteína transportadora de ésteres de colesterol con las concentraciones de colesterol en lipoproteínas de alta densidad. En población mexicana, se han informado consistentemente concentraciones de colesterol en lipoproteínas de alta densidad, inferiores a las de grupos caucásicos.

El propósito de este estudio fue conocer la influencia del polimorfismo del gen de la proteína transportadora de ésteres de colesterol sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas, particularmente en el colesterol de lipoproteínas de alta densidad, en una muestra tomada al Sur de la Ciudad de México.

Se realizó un estudio transversal en el que se seleccionaron profesores de escuelas públicas y privadas de la Ciudad de México. Los lípidos y lipoproteínas se midieron en sangre venosa obtenida en ayuno. El DNA genómico se obtuvo de leucocitos y con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa se amplificó parte del intrón 1 del gen de la CETP, el cual se digirió con la enzima *Taq1B*. El tamaño de los fragmentos de restricción se analizó en gel de agarosa al 3%.

Se analizaron los datos de 219 sujetos, 166 mujeres y 53 hombres. La frecuencia alélica para B1 y B2 fue de 0.48 y 0.52 respectivamente. Los valores promedios de los lípidos por genotipo mostraron diferencias significativas sólo en el colesterol total y en el colesterol de lipoproteínas de baja densidad en mujeres ($p < 0.05$). La prevalencia de hipoalfalipoproteinemia (colesterol en lipoproteínas de alta densidad < 35 mg/dL) fue de 31%, 22% y 11% para los genotipos B1B1, B1B2 y B2B2, respectivamente ($\chi^2 = 10.92$, $p < 0.05$). El riesgo relativo de hipoalfalipoproteinemia para el genotipo B1B1 fue 2.3 veces mayor al compararlo con el genotipo B2B2.

La frecuencia del alelo B1 fue menor que la informada en población caucásica, pero el genotipo B1 se asoció, aunque no significativamente, con concentraciones bajas de colesterol en lipoproteínas de alta densidad, lo cual parece indicar que aunque el polimorfismo del gen de la CETP-*Taq1B*, influye sobre las concentraciones, no es el principal determinante en la población de la Ciudad de México.

II) INTRODUCCIÓN

1. LIPOPROTEÍNAS

Los lípidos (del griego *lipus*, grasa) se definen como compuestos orgánicos insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como: éter, cloroformo y benceno. No obstante, en los sistemas biológicos los lípidos son transportados desde el tejido de origen (hígado), hasta el tejido donde son absorbidos. Para poder ser transportados, éstos deben de estar empaquetados en moléculas conocidas como lipoproteínas. Estas lipoproteínas son estructuras esféricas muy variadas en cuanto tamaño y composición. Básicamente consisten de una porción central formada por lípidos hidrofóbicos (triglicéridos y ésteres de colesterol), alrededor del núcleo de la lipoproteína se encuentra una capa anfipática de lípidos polares (fosfolípidos y colesterol no esterificado ó libre), y en la superficie o inmersas en la capa anfipática, se encuentran una o más proteínas denominadas apoproteínas (Figura 1).

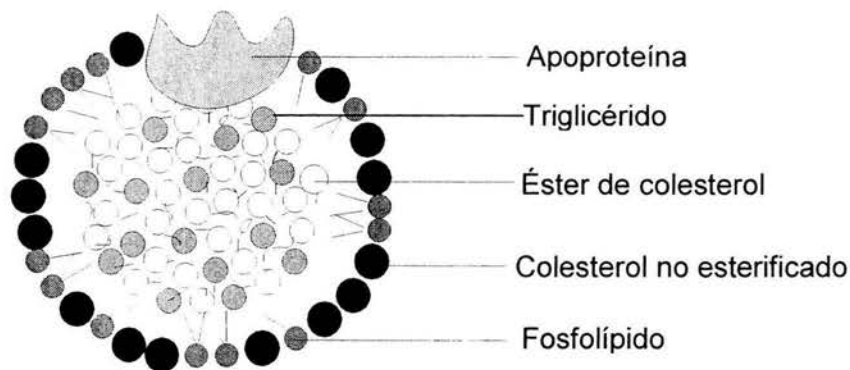


Figura 1. Representación esquemática de la organización de los lípidos en una lipoproteína. Las apolipoproteínas se unen por interacciones hidrofóbicas a los lípidos más externos y por atracciones electrostáticas a los fosfolípidos para estabilizar a la pseudo-micela lipídica.

Las lipoproteínas se clasifican en 6 grupos basándose en su densidad relativa con respecto al agua: quilomicrones (Qm), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, de Very Low Density Lipoprotein), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, de Intermedie Density Lipoprotein), lipoproteínas de baja densidad (LDL, de Low Density Lipoprotein), lipoproteínas de alta densidad (HDL, de High Density Lipoprotein), y la lipoproteína(a) [Lp(a)] (Tabla 1). De acuerdo a su densidad y a su composición de apolipoproteínas, las HDL se han clasificado en HDL_{2a}, HDL_{2b} y HDL₃ (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, 4 ó 5 subclases han podido ser identificadas¹⁻³.

Tabla 1. Porcentajes de lípidos en las principales lipoproteínas¹

LIPOPROTEÍNA	DENSIDAD (g/mL)	LÍPIDOS (%)	COL. (%)	TG. (%)	FL. (%)
Qm	<1.006	98	4	90	6
VLDL	0.95-1.006	90	18	62	20
IDL	1.006-1.019	80	35	35	30
LDL	1.006-1.063	75	60	10	30
Lp (a)	1.050-1.12	65	60	10	30
HDL	1.063-1.210	50	36	14	50

COL: colesterol; TG: triglicéridos; FL: fosfolípidos; Qm: quilomicrones VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; IDL: lipoproteínas de densidad intermedia; LDL: lipoproteínas de baja densidad; Lp (a): lipoproteína (a); HDL: lipoproteína de alta densidad.

1.1. Proteínas asociadas a lipoproteínas

Las apoproteínas (o apos como comúnmente se les abrevia), se unen a los lípidos mediante interacciones no covalentes y sus funciones son: estructurales, ligandos de receptores y cofactores de enzimas del metabolismo de lípidos. En el Tabla 2 se describen las diferentes apoproteínas y sus características.

Tabla 2. Características de las principales apoproteínas¹.

NOMBRE	PM (KDa)	[mg/dL]*	SITIO DE SÍNTESIS	FUNCIÓN	LIPOPROTEÍNAS
B-100	550	80-100	Hígado	Proteína estructural, ligando para receptor	VLDL, IDL, LDL
B-48	250	< 5	Intestino	Proteína estructural	Qm
E	34	2-6	Hígado, macrófagos y astrocitos	Ligando para receptor hepático	Qm, VLDL, IDL, HDL
A-I	28	00-150	Intestino, e hígado	Proteína estructural de HDL, y activador de LCAT	HDL, y Qm
A-II	17	30-50	Intestino, hígado	Proteína estructural de HDL	HDL y Qm
A-IV	46	5	Intestino	Transporte de apoproteínas entre lipoproteínas	HDL y Qm
C-I	6.6	6	Hígado	Activación de LCAT	HDL, VLDL, Qm
C-II	8.9	3-8	Hígado	Activación de LLP	HDL, VLDL, Qm
C-III	8.8	8-15	Hígado	Inhibe LLP, y modula la captación de triglicéridos en los remanentes	HDL, y Qm

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; IDL: lipoproteínas de intermedia densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; Qm : quilomicrones; HDL: lipoproteína de alta densidad. LCAT: lecitina-colesterol-acil-transferasa; LLP: lipasa lipoprotéica. * Concentración en plasma.

1.2. Enzimas asociadas al metabolismo de lipoproteínas

Varias enzimas son necesarias para el metabolismo de las lipoproteínas, influyen en la concentración de los lípidos; favoreciendo el transporte de lípidos (enzimas transferasas), hidrolizando los lípidos (enzimas catalíticas), uniendo moléculas (enzimas ligasas) y en la oxidación de los lípidos (enzimas óxidorreductasas). En la tabla 3, se enlistan algunas de las características de éstas enzimas.

Tabla 3. Enzimas del metabolismo de lipoproteínas^{1, 4-8.}

NOMBRE	FUNCIÓN	ORIGEN
LCAT	Esterifica el colesterol libre de los tejidos periféricos y lo transporta a las HDL ₃	Hepático
LH	Hidroliza los triglicéridos de las lipoproteínas VLDL, LDL y HDL _{2b} .	Hepático
LLP	Hidroliza los triglicéridos de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor.	Tejido adiposo Pared endotelial Pulmón
PON	Tiene acción antioxidativa protegiendo a las LDL de ser oxidadas por los radicales libres.	Hepático
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triglicéridos de HDL _{2b} a VLDL, IDL, LDL	Tejido adiposo Hepático Intestino delgado
PLTP	Transporta fosfolípidos y colesterol de lipoproteínas ricas en triglicéridos hacia las HDL.	Intestino delgado Páncreas Varios más

LCAT: Lecitin: colesterol acil-transferasa; LH: Lipasa hepática; LLP: Lipasa lipoprotéica; PON: Paraoxonasa; CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol.

1.3. Metabolismo de las lipoproteínas

Las lipoproteínas se remodelan constantemente durante su tránsito por el plasma debido a cambios en la composición y concentración de lípidos. Existen tres vías metabólicas para las lipoproteínas: a) La vía exógena, b) La vía endógena y c) El transporte reverso del colesterol.

a) Vía exógena

Las grasas contenidas en los alimentos que ingerimos, no pueden ser absorbidas directamente por el intestino, de modo que pasan al duodeno donde son catabolizadas generándose ácidos grasos y colesterol libre. Los ácidos grasos libres pasan a los enterocitos del intestino delgado donde se ensamblan con ta pequeñas cantidades de colesterol y fosfolípidos, además de las apolipoproteínas B-48, y A-I, formando Qm. Estos Qm pasan a los vasos linfáticos y finalmente a la circulación. En plasma, intercambian fosfolípidos y apoA-I por apoC-II, apo-E y ésteres de colesterol con las HDLs. La lipasa lipoprotéica, utilizando apoC-II como cofactor, hidroliza los triglicéridos de los Qm, produciendo ácidos grasos libres que son utilizados como fuente de energía o de reserva, además de remanentes de Qm. Estos remanentes son enriquecidos con ésteres de colesterol que proviene de las HDL por acción de la CETP, posteriormente son captados por el hígado a través del receptor del remante o receptor de apo-E, para la posterior síntesis de lipoproteínas y ácidos biliares^{9,10} (Figura 2).

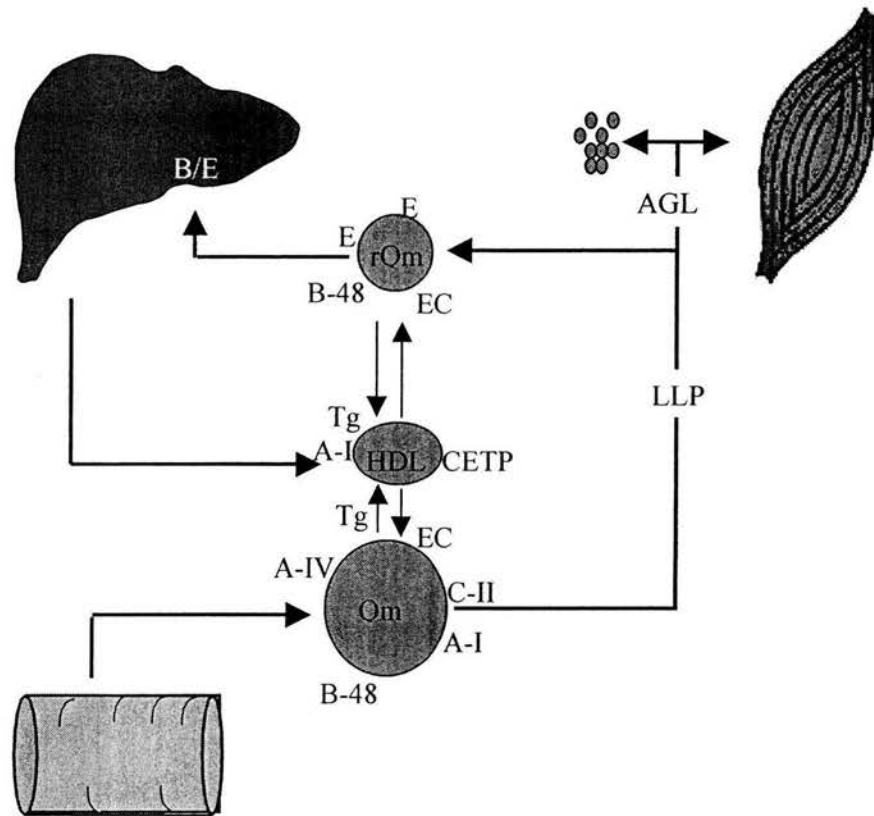


Figura 2. Vía exógena ó metabolismo de los quilomicrones. B-48, E, C-II, A-I: apolipoproteínas, Tg: triglicéridos, EC: ésteres de colesterol, B/E: receptor para apolipoproteínas B/E, rQm: remanente de quilomicrón, Qm: quilomicrón, HDL: lipoproteína de alta densidad, CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol, LLP: lipasa lipoprotéica, AGL: ácidos grasos libres.

b) Vía endógena

Las VLDL se sintetizan en el aparato de Golgi de los hepatocitos a partir del ensamblaje de ácidos grasos libres, glicerol, pequeñas cantidades de colesterol y apoB-100; en el torrente sanguíneo, recibe apo-E y apoC-II de las HDLs. En circulación, la VLDL es hidrolizada por la enzima lipasa lipoprotéica, liberando ácidos grasos que el cuerpo utiliza ya sea para la elaboración de energía o como de reserva. La enzima lipasa hepática sigue hidrolizando a la VLDL, convirtiéndola en una partícula más pequeña, de densidad intermedia (IDL). Estas IDL pueden seguir dos caminos: 1.- pueden ser captadas por el hígado a través del receptor apo-E/B, 2.- al pasar más tiempo en la circulación, más triglicéridos pueden seguir siendo hidrolizados por la LH, disminuyendo el tamaño de la partícula para finalmente convertirse en LDL^{9, 10} (Figura 3).

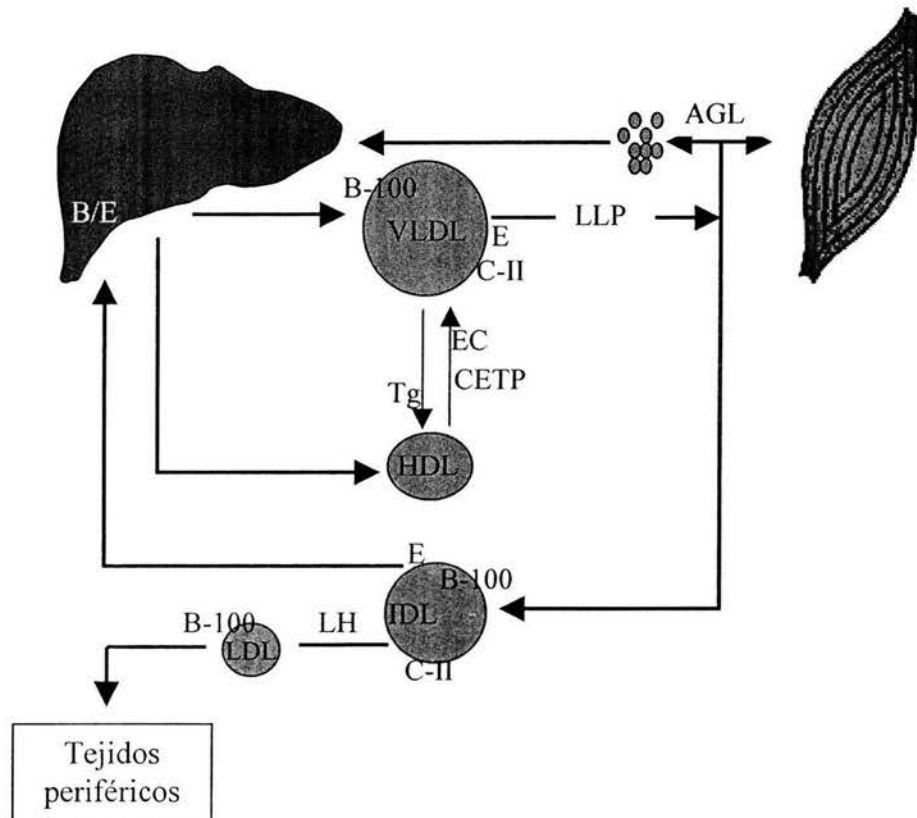


Figura 3. Vía endógena ó metabolismo de VLDL. B-100, E, C-II: apolipoproteínas, EC: ésteres de colesterol, Tg: triglicéridos, VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, IDL: lipoproteína de densidad intermedia, LDL: lipoproteína de baja densidad, LLP: lipasa lipoprotéica, LH: lipasa hepática, CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol, AGL: ácidos grasos libres.

c) Transporte reverso del colesterol

Este proceso es también conocido como metabolismo de HDL (Figura 4) por este medio se transporta hacia el hígado casi el 80% de colesterol provenientes de las células periféricas¹¹. Las HDL se sintetizan en el hígado e intestino delgado, y son secretadas a la circulación en forma de HDL nacientes ó discoides; éstas pueden formarse como resultado de la interacción de membranas plasmáticas con apo-AI que es secretada junto con pequeñas cantidades de fosfolípidos y colesterol libre. La enzima LCAT localizada en la superficie de la HDL naciente esterifica el colesterol de células periféricas que al incorporarse al núcleo de la partícula aumenta el tamaño, pasando a ser una HDL₂, enriquecida de ésteres de colesterol. El colesterol esterificado puede seguir dos rutas: 1) ser eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el que interviene el receptor hepático SR-BI o, 2) por la acción de la CETP ser intercambiado por TG provenientes de las lipoproteínas que contengan apo-B (VLDL, IDL, LDL)¹¹.

Además de los lípidos hidrofóbicos, los fosfolípidos de las HDL también son transferidos hacia las VLDL por la proteína de transporte de fosfolípidos (PLTP)⁷. Los triglicéridos de las HDL₂ provenientes de las lipoproteínas ricas en triglicéridos son entonces hidrolizados por la lipasa hepática. Esta hidrólisis en asociación con la actividad PLTP, disminuye el tamaño de las HDL transformándolas en HDL₃ y en partículas pre-β1 que pueden reiniciar el ciclo de captación de colesterol.

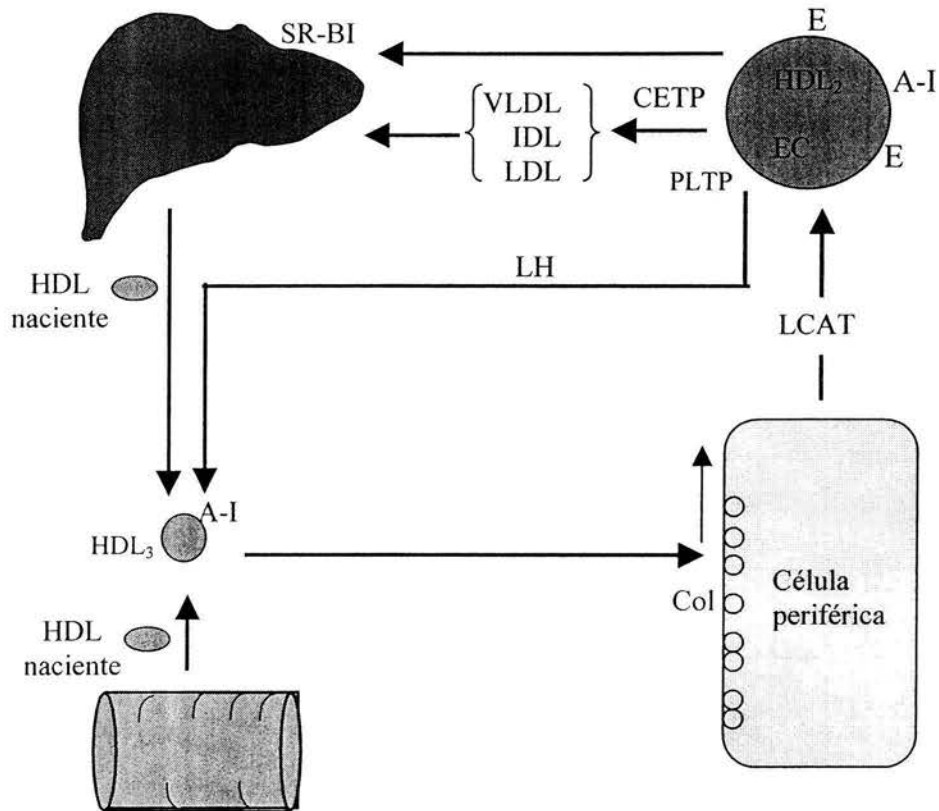


Figura 4. Metabolismo de HDL ó transporte reverso del colesterol. E, A-I: apolipoproteínas, SR-BI: receptor scavenger, EC: ésteres de colesterol, Col: colesterol libre, VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, IDL: lipoproteína de densidad intermedia, LDL: lipoproteína de baja densidad, HDL: lipoproteína de alta densidad, LH: lipasa hepática, PLTP: proteína transportadora de fosfolípidos, CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol, LCAT: lecitina colesterol acil transferasa.

2. ANTECEDENTES

2.1. Factores de riesgo de enfermedad arterial coronaria

Varios estudios epidemiológicos desarrollados en los últimos 50 años han identificado numerosos factores de riesgo coronarios (FRC) que participan en la etiología de las enfermedades cardiovasculares. Estos factores se pueden dividir en 2 tipos: a) modificables: dislipidemia, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus, y b) no modificables: edad, género e historia familiar de aterosclerosis¹². Unos de los principales factores de riesgo coronario que más se han estudiado son las dislipidemias. El término se refiere a cualquier alteración en las concentraciones de lípidos en la sangre. En 1967 Frederickson y Levy¹³ propusieron clasificar a las distintas dislipidemias en cinco fenotipos, en 1976, la Organización Mundial de la salud (OMS) la actualizó, con base en la concentración de colesterol y triglicéridos, sin tener en cuenta las concentraciones de colesterol de HDL (a sabiendas que bajas concentraciones de C-HDL son un factor para desarrollar enfermedad arterial coronaria), razón por lo cual tiene ciertas deficiencias, además de omitir la etiología de las dislipidemias. Sin embargo, ésta clasificación sigue siendo útil en la práctica clínica.

2.2. Lipoproteínas y aterosclerosis

El estudio detallado de los mecanismos aterogénicos ha llevado a descubrir el papel etiológico de las lipoproteínas en la aterosclerosis. Mediante varios estudios epidemiológicos, clínicos y de biología molecular se ha demostrado que el colesterol es parte fundamental en la patogénesis de la aterosclerosis¹⁴. Por ejemplo, en el estudio de Helsinki¹⁵, Framinham¹⁶ y el de PROCAM¹⁷, las concentraciones de colesterol total y colesterol de LDL se asociaron directamente con la incidencia de cardiopatía aterosclerosa, mientras que el colesterol de HDL se asoció inversamente con esta enfermedad.

De acuerdo con la OMS, la aterosclerosis es una enfermedad multifactorial consistente en lesiones

de la íntima arterial causada por los diferentes factores de riesgo, como el exceso de colesterol, el tabaquismo, bajas concentraciones de C-HDL, hipertensión, diabetes, concentraciones elevadas de homocisteína, síndrome plurimetabólico y sedentarismo¹⁸. En las arterias sanas, la superficie de la íntima está constituida por un fino revestimiento de células endoteliales, que descansan sobre una membrana basal por debajo de la cual se encuentra el llamado espacio subendotelial, que representa el escenario principal del proceso aterogénico. A pesar de su aspecto aparentemente inerte, el endotelio se encarga de funciones importantes como el mantenimiento del tono vascular, la producción de moléculas antitrombóticas y el control de la permeabilidad de la pared arterial de las moléculas y células circulantes¹⁹.

Los eventos que se llevan a cabo durante la aterosclerosis, se han estudiado en modelos animales, principalmente en conejos y roedores. Actualmente se acepta que el primer paso de la aterogénesis, después de una dieta rica en grasas y colesterol, es la acumulación de lipoproteínas en el espacio subendotelial, especialmente en sitios como las bifurcaciones arteriales y en las superficies divisorias del flujo sanguíneo. La internalización de LDL hacia la íntima, se realiza de forma pasiva a través de las uniones que hay entre una célula endotelial y otra. Un hecho trascendental en la formación de la placa aterosclerosa es la oxidación de los lípidos. La retención de las lipoproteínas en la pared arterial involucra interacciones de las lipoproteínas que contienen apo-B y proteoglicanos de la matriz extracelular. Las LDL sufren modificaciones oxidativas como resultado de la interacción con elementos pro-oxidantes como la enzima 12/15 lipoxigenasa la cual inserta oxígeno en los ácidos grasos. En la íntima, las LDLox son reconocidas y capturadas en grandes cantidades por monocitos, los cuales se diferencian en macrófagos y posteriormente en células espumosas secretoras de sustancias quimioatrayentes que promueven la migración de células musculares lisas de la capa media, hacia el espacio subendotelial, donde bajo la influencia de éstas mismas sustancias proliferan y cambian su fenotipo, pasando de ser células contráctiles a células secretoras de sustancias quimiotóxicas. De igual forma las células espumosas elaboran sustancias

que llegan a las células endoteliales para producir moléculas de adhesión como integrinas y selectinas además de factores de crecimiento de leucocitos. Las moléculas de adhesión por un mecanismo de anclaje, unen a leucocitos situados en la pared arterial para internalizarlos. En la íntima, los linfocitos T interactúan con células espumosas, estimulando la producción de sustancias pro inflamatorias como el interferón gama (IFN- γ). Con el tiempo las placas se hacen más duras y fibrosas, iniciando el engrosamiento de la pared vascular y aumentando el grado de la obstrucción de la luz arterial.

En las lesiones avanzadas se puede llegar a dar la ruptura de la placa, aunque estudios patológicos indican que esto depende en gran parte de la composición y vulnerabilidad de la placa, más que de la severidad de la estenosis. Las capas vulnerables generalmente son delgadas y presentan una elevada concentración de células pro-inflamatorias. Lo que trae como consecuencia que macrófagos que producen varias enzimas como: proteasas y colagenasas, degraden a la placa, llevando a la ruptura de la misma, dando inicio a la cascada de coagulación, seguido de la formación del trombo que puede llegar a ocluir el flujo sanguíneo, resultando todo esto en un infarto al miocardio o daño cerebrovascular¹⁸⁻²⁰.

En México, las enfermedades crónico degenerativas en las últimas dos décadas han ido en aumento. El último reporte de la Secretaría de Salud indica que actualmente las enfermedades del corazón ocupan la primera causa de defunción en el Distrito Federal con una tasa de 107/100,000 habitantes para 1997 y de 100/100,000 para 1998. Su morbilidad supera en mucho a otras enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes mellitus o los padecimientos renales o pulmonares²¹.

2.3. CETP

La proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP, por sus siglas en inglés) es una glicoproteína con alta concentración de aminoácidos hidrofóbicos (casi 44%), y con un peso

molecular de aproximadamente 74,000 daltons. El gen está localizado en el brazo largo del cromosoma 16, en la posición q12-21, consta de 16 exónes y 15 intrónes y juntos tienen aproximadamente 25 Kb de DNA genómico. El cDNA de la CETP tiene 53,000 pb, ésta disminución en tamaño con respecto al tamaño del gen pone de manifiesto que existen modificaciones post-transcripcionales antes de dar origen a la proteína de 476 aminoácidos²².

En el humano, los órganos con el contenido más alto de RNAm de CETP son el hígado, el bazo, y el tejido adiposo, aunque también, se ha encontrado en menor cantidad en intestino delgado, glándulas adrenales, riñón, y corazón. En varias especies animales, el tejido que más CETP sintetiza es el tejido adiposo²².

En el plasma, la CETP circula principalmente unida a HDL, intercambiando lípidos neutros (triglicéridos, ésteres de colesterol, y ésteres de retinol), y fosfolípidos, entre las lipoproteínas²³. Aún se desconoce cómo se une la CETP con el éster de colesterol y como es que ésta lo transfiere de las HDL a las VLDL, IDL y LDL, sin embargo, existen datos que sugieren un acarreo selectivo ya que la CETP, al parecer, tiene sitios de unión tanto para ésteres de colesterol como para triglicéridos, y fosfolípidos³¹ (Figura 5). Son varias las evidencias que apoyan esta hipótesis, por ejemplo, la unión de los aminoácidos hidrofóbicos a lípidos neutros y fosfolípidos²⁴, la alta estabilidad del complejo CETP-fosfatidilcolina en la superficie de las lipoproteínas, el cual depende de un delicado balance hidrófobo y electrostático, producto de las diferentes concentraciones de sales^{25, 26}.

Intercambio de lípidos por CETP

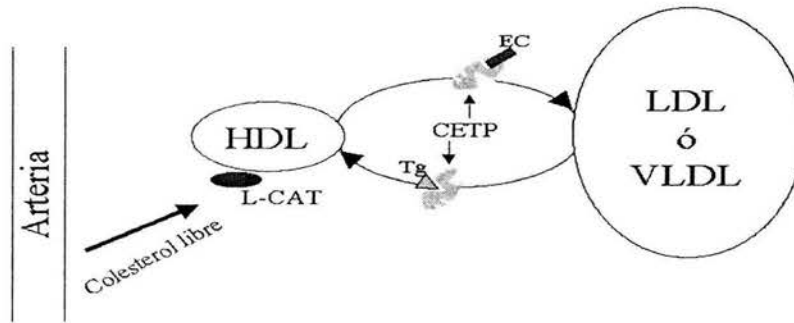


Figura 5. Mecanismo de intercambio de ésteres de colesterol (EC) por triglicéridos (Tg) mediado por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) entre las lipoproteínas de alta (HDL), baja (LDL) y muy baja densidad (VLDL).

2.4 Regulación del gen para CETP

La utilización de varios modelos animales ha sido necesaria para poder entender los mecanismos por los cuales se regula la expresión de este gen. Una observación común en todos estos estudios, es que la concentración del RNAm, la actividad y la masa de CETP se incrementa en el animal experimental con una dieta alta en colesterol y en grasas saturadas^{23, 27}, similar a lo observado en humanos, las concentraciones plasmáticas de CETP presentan cambios en respuesta a variaciones a la ingesta de colesterol²². También, utilizando diferentes líneas celulares a las que se les incubó en presencia de colesterol, se ha observado un incremento del RNAm de CETP, sin embargo, estos estudios tienen ciertas limitaciones, ya que aunque una amplia variedad de células poseen la capacidad de secretar CETP, el significado fisiológico es incierto, ya que en algunos casos los valores de actividad son extremadamente bajos²².

Las causas por las cuales la CETP es sintetizada en respuesta a una dieta rica en colesterol o grasas no esta muy clara, sin embargo, experimentos en los que se ha examinado la regulación del gen en ratones transgénicos que expresan la CETP humana junto con sus regiones adyacentes, las cuales contienen información en pares de bases suficiente para tener una expresión similar a la CETP nativa humana, han mostrado que con una dieta alta en colesterol, la síntesis del RNAm de CETP hepático, se incrementa de 4 a 10 veces más²². En contraste con estos resultados, ratones transgénicos en los cuales la expresión del gen de CETP es controlada por otro promotor diferente al natural, no muestran aumento en la síntesis del RNAm, masa o actividad de CETP. Estos resultados apuntan a que el incremento del RNAm hepático de CETP, así como su concentración en plasma, inducido por una dieta alta en colesterol, es en gran parte mediado por el incremento en la transcripción del gen de la CETP. Además, el incremento en la transcripción, requiere forzosamente las secuencias naturales que flanquean al gen de la CETP humana, lo que sugiere que estas regiones presentan un elemento de respuesta al colesterol, que media el incremento en la transcripción del gen en respuesta a alteraciones en la dieta de colesterol²⁸.

La actividad física, se ha reportado que se encuentra asociada con un decremento en la concentración plasmática de CETP; este decremento pudiera estar dado por una disminución en la concentración del tejido adiposo, ya que es en este tejido donde se lleva a cabo la mayor síntesis de CETP²³.

Además de la hipercolesterolemia y la actividad física, la concentración de CETP es también alterada por hormonas esteroides y drogas estimulantes. Se ha reportado que la actividad de CETP se incrementa durante el primer trimestre del embarazo²⁹. Mientras que el fármaco probucol se ha asociado con un incremento de CETP en plasma.

2.5. CETP y su relación con la hipoalfalipoproteinemia

La hipoalfalipoproteinemia se define como concentraciones plasmáticas de C-HDL por debajo de la décima percentila ajustada por la edad y sexo del sujeto. Las causas de niveles bajos de C-HDL aún no se conocen con certeza³¹, aunque se ha observado que los factores hereditarios desempeñan un papel importante en el desarrollo de la hipoalfalipoproteinemia^{10, 30}, no se han identificado la o las proteínas directamente involucradas en la dislipidemia. En este sentido, las deficiencias de factores plasmáticos que intervienen en la remodelación de las HDL son el origen más probable de las hipoalfalipoproteinemias³¹.

Entre los factores plasmáticos de remodelación de las HDL, destacan las proteínas y enzimas de transporte que intervienen en el transporte reverso del colesterol. En primer lugar, los niveles plasmáticos de C-HDL están regulados por la CETP en el humano. Se ha observado que la deficiencia de CETP o la disminución de su actividad, provoca un incremento en las concentraciones plasmáticas de C-HDL, por el contrario, mayor actividad de CETP provoca una disminución en la concentración de C-HDL³².

Se sabe que la CETP es importante en el transporte reverso del colesterol, sin embargo, existe controversia en si sus funciones favorecen o no la aterogénesis. Por ejemplo, la CETP tiene un papel central en el catabolismo del colesterol depositado en las placas aterosclerosas al modular su transporte de regreso al hígado, por lo tanto tiene un papel antiaterogénico³³. Sin embargo, en ratones transgénicos que sobreexpresaron la proteína CETP de simio, al ser tratados con una dieta rica en colesterol, resultan tener más aterosclerosis que los controles que no la expresarán.³⁴

Los datos obtenidos en el estudio del corazón de Honolulu (Honolulu heart study) indicaron que cuando la deficiencia de CETP se asoció con una concentración de C-HDL de 40 a 60 mg/dL, el riesgo de desarrollar enfermedad arterial coronaria es más alto que cuando se compara a sujetos con concentraciones similares de C-HDL, pero con CETP normal. Además, en este mismo estudio se

observó que en sujetos con concentraciones de C-HDL mayores a 60mg/dL, el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria fue bajo, independientemente de la presencia o ausencia de CETP. Estas observaciones apoyan la idea de que una deficiencia de CETP puede ser pro-aterogénica si se acompaña con una modesta concentración de C-HDL. Por el contrario, si la deficiencia de CETP es acompañada por un incremento más substancial en las concentraciones de C-HDL, los efectos de este incremento, pueden tener un efecto anti-aterogénico³⁵.

Los modelos de ratones modificados genéticamente a los cuales se les injerta el gen de la CETP humana para su posterior manipulación, se han criticado fuertemente por el hecho de que los animales presentan perfiles lipídicos muy alterados, con concentraciones de lípidos de hasta diez veces más altas que las de un ratón normal. Además, esta especie tiene un metabolismo diferente al del humano; carece de CETP y su apo A-II no forma dímeros. Por lo tanto, extrapolar los resultados obtenidos en animales al humano resulta muy aventurado³⁶.

Varias mutaciones han sido reportadas para del gen de la CETP, relacionadas con la pérdida total o parcial de la proteína^{37, 38}, o con la sustitución de una base ya sea en un intrón o un exón^{39, 40}. Una de las variantes identificable por la enzima de restricción *Taq1B*, se encuentra localizada en el intrón 1 del gen de la CETP, específicamente en el nucleótido 277. La enzima genera dos alelos, el alelo B1 y B2, producto de la sustitución de una guanidina por una adenina. La combinación de estos dos alelos da como resultado tres fenotipos, un homocigoto B1, un heterocigoto B1B2, y un homocigoto B2 (Figura 6). En poblaciones caucásicas las variantes identificadas por la *Taq1B*, las han asociado tanto con la concentración como con la actividad de CETP, con la concentración de apo A-I y de C-HDL^{41, 42}. Existen varias evidencias de que personas que son portadoras del alelo B1B1, la actividad CETP está elevada y la concentración de colesterol en HDL se encuentra disminuida si se les compara con personas que poseen el genotipo B1B2 y B2B2^{43, 44}. El mismo patrón de asociación se ha encontrado en poblaciones asiáticas⁴⁵.

La magnitud del efecto del polimorfismo sobre la actividad, la concentración de CETP y la concentración de los lípidos en especial de C-HDL, varía entre una y otra población, lo que demuestra claramente que existe un efecto desigual.

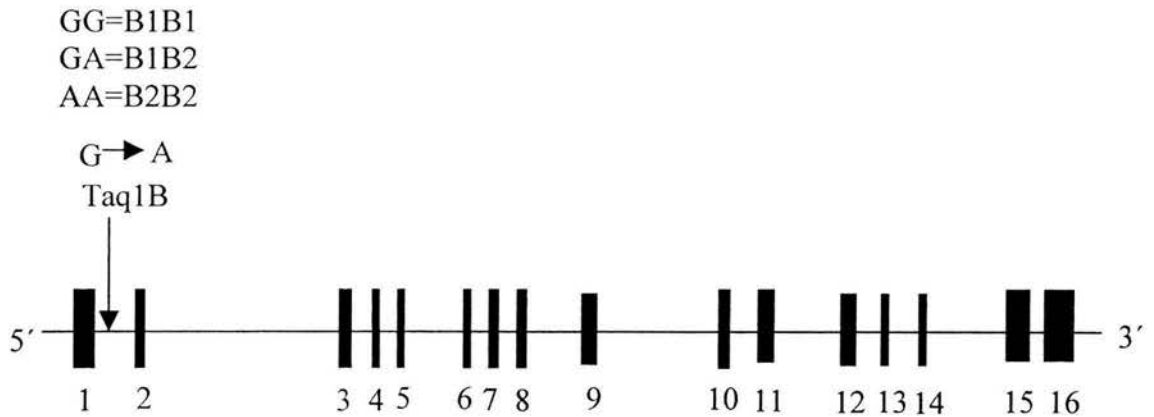


Figura 6. Esquema del gen de la CETP, La flecha indica la localización del intrón 1 y sus variantes en función de la endonucleasa de restricción *Taq1B*. El genotipo B1B1 presenta dos guanidinas (G), el B1B2 presenta la sustitución de una guanidina por una adenina (G→A), mientras que el genotipo B2B2 presenta la sustitución de las dos guanidinas por adeninas.

III) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientes estudios en la población mexicana han informado que factores de riesgo como: la obesidad⁴⁶, y las distintas dislipidemias, entre ellas la hipoalfalipoproteinemia (HA)⁴⁷, son muy frecuentes en nuestra población. Se piensa que la HA tiene un trasfondo genético, ya que en estudios realizados en sujetos con similar carga genética, pero en medio ambiente diferente, como los México-Americanos, presentan valores de C-HDL parecidos a los de la población mexicana. Estas observaciones sugieren la participación de factores genéticos y no ambientales en la elevada prevalencia de hipohalfalipoproteinemia entre la población mexicana. Se ha sugerido que la hipohalfalipoproteinemia en mexicanos es secundaria a la hipertrigliceridemia y obesidad, que caracterizan a nuestra población, sin embargo, en un estudio llevado a cabo recientemente en la población mexicana⁴⁷, se encontró que 50% de la hipohalfalipoproteinemia es explicada por la hipertrigliceridemia, y el otro 50% pudiera resultar de la coexistencia de otros factores como el estilo de vida y genéticos.

Así mismo, análisis multivariados han mostrado que el genotipo CETP-*Taq1B* se ha asociado de manera independiente a los valores de C-HDL en distintas poblaciones^{42, 43}. Por esta razón, se considera relevante estudiar el polimorfismo de la CETP y su asociación con los valores de lípidos, en nuestra población.

IV) OBJETIVOS DEL PROYECTO

1. Implementar un método basado en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la obtención de fragmentos de restricción con la enzima *Taq1B*.
2. Determinar la frecuencia de las variantes polimórficas del intrón 1 del gen de la CETP en una muestra obtenida en población de la Ciudad de México.
3. Investigar la asociación del polimorfismo del gen de la CETP con las concentraciones de colesterol total, colesterol en HDL, en LDL y triglicéridos.
4. Averiguar si existe una asociación entre el polimorfismo de la CETP y algunos factores de riesgo para desarrollar EAC.

V) HIPÓTESIS

1. El análisis del polimorfismo *Taq1B* del gen de la CETP, presenta un gradiente de asociación de los genotipos B1B1, B1B2 y B2B2 con las concentraciones de C-HDL, siendo el genotipo B1B1 el que más se asocia con las concentraciones bajas de C-HDL.
2. Si las concentraciones de C-HDL son bajas en la población de la Ciudad de México, entonces encontraremos una alta frecuencia del alelo B1.

VI) MATERIAL, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO

1) MUESTRA POBLACIONAL

Se estudiaron 219 sujetos adultos, 53 hombres y 166 mujeres de entre 40±10 años de edad, habitantes de la Ciudad de México que aceptaron participar voluntariamente en el estudio.

2) TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio transversal observacional del tipo descriptivo, los sujetos se agruparon por el genotipo de CETP-*Taq1B*.

3) ANÁLISIS DE LABORATORIO

Después de 10 h. de ayuno, con el paciente en posición sedente por 20 minutos y evitando la estasis venosa (menos de un minuto), se tomó una muestra de 10 ml de sangre en tubos con EDTA (1mg/ml). El plasma se separó por centrifugación a 2500 r.p.m. por 20 minutos. La concentración de CT, y TG, se determinó por métodos enzimáticos (Boehringer Mannheim), en un autoanalizador Hitachi 705. Las concentraciones de colesterol de HDL se midieron después de precipitar a las lipoproteínas que contenían apoB con fosfotugsnato-MgCl₂⁴⁸. Los valores de las lipoproteínas de baja densidad se calcularon empleando la fórmula de Friedewald modificada por DeLong⁴⁹. Todas las mediciones se realizaron bajo estricto control de calidad, mediante la participación del laboratorio de Lípidos del Instituto Nacional de Cardiología en el Programa de Estandarización de Lípidos del CDC (Center for Disease Control and Prevention), de Atlanta Georgia, EUA. Para que un laboratorio sea certificado y avalado por este centro, los coeficientes de variaciones en los reportes no deben ser menores de 4%.

a) Extracción de DNA

El DNA se obtuvo de leucocitos por el método de expulsión salina modificado⁵⁰. El paquete celular de 10 ml de sangre se colocó en un tubo cónico de 50 mL, se agregaron 40ml de buffer de lisis de células rojas (SLR 1X), (apéndice A), se mezcló suavemente por inversión durante un minuto y se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el paquete de células blancas se resuspendió nuevamente con 20 mL de SLR 1X para la segunda centrifugación a 1200 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el paquete de células blancas se resuspendió en 160 µL de buffer de proteinasa K 5X (ver apéndice A), 60 µL de proteinasa K (10 µg/µL), 50 µL de SDS 20%, y 260 µL de agua bidestilada, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL e incubó toda la noche a 37°C. Después de la incubación, se añadieron 240 µL de NaCl 5 M, se mezcló por 15-20 segundos, y se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le adicionaron 900 µL de etanol al 95%, el tubo se invirtió repetidas veces durante un minuto. Cuando se observó un precipitado de color blanco se centrifugó a 14 000 r.p.m. por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla que se formó se lavó con 900 µL de etanol al 75%, se centrifugó de nuevo a 14 000 r.p.m. por 1 minuto. Se desechó el sobrenadante por decantación y el DNA se secó en una cámara a 37° C. Posteriormente, se resuspendió en 100 µL de agua inyectable. La concentración de DNA se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. La pureza se determinó por el cociente 260 nm/280 nm. (La relación para un DNA puro oscila entre 1.5-1.7).

Fórmula para determinar la concentración de DNA:

$$\mu\text{g/mL} \text{ ó } \text{ng}/\mu\text{L} \text{ de DNA} = (\text{abs. a } 260) (\text{factor de dilución}) (50)^*$$

* 50 es una constante para los ácidos nucleicos de cadena doble.

I.Z.T.



b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polimerase Chain Reaction) es una técnica usada en estudios de biología molecular y genética para reproducir fragmentos específicos de DNA. Este método se basa en la capacidad de una enzima polimerasa para unir bases nitrogenadas a una cadena de DNA. Para que la enzima inicie su función, la enzima debe reconocer un segmento u oligómero de 20 a 25 bases nitrogenadas de cadena simple de DNA, estas secuencias se conoce como iniciadores y flanquean el segmento de DNA que se desea amplificar tanto en el extremo 3' como en el 5'. La finalidad de amplificar un segmento específico de DNA por medio de esta técnica es la obtención de millones de copias del fragmento de interés.

La amplificación se llevó acabo usando, 50 pmol de cada iniciador con la secuencia:

5'-CACTAGCCCAGAGAGAGGAGTGCC-3'

3'-CTGACGCCAGCCGCACACTAAC-5'

descritos por Fumeron ⁵¹, 200 μ M de dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.5 U de la enzima Taq-polimerasa (Boehringer Cat. No. 2544) y 800 ng de DNA genómico en un volumen final de 50 μ L. (Apéndice B). La PCR se realizó en un termociclador (Techne mod. 62-6027) con la siguiente secuencia: desnaturalización por 5 minutos a 95°C, 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 60°C y 1 minuto de elongación a 72°C (30 ciclos), finalmente se realizó un paso de elongación de 8 minutos a 72°C.

c) Verificación de la amplificación

Los ácidos nucleicos pueden ser analizados por electroforesis debido a que en pH neutro, los grupos fosfato les confieren una carga neta negativa. Esta carga eléctrica hace que en un campo eléctrico el DNA migre en dirección al polo positivo, si además, los ácidos nucleicos se hacen migrar en un gel de agarosa, las moléculas más pequeñas migran más rápido que las grandes separándose según su

tamaño.

En este estudio para verificar que el segmento de DNA de interés haya amplificado y que este era del tamaño correcto, el producto de la PCR se analizó en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 0.5 X (Apéndice C).

d) Digestión del producto de la PCR con la enzima *TaqIB*

Las enzimas de restricción son enzimas que cortan el DNA en secuencias específicas de aproximadamente 5-6 pares de bases, se unen a la doble cadena de DNA, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces covalentes entre el grupo fosfato de un nucleótido y la ribosa del nucleótido contiguo, generando fragmentos de DNA. Muchas de estas enzimas, actúan en secuencias palindrómicas, es decir, secuencias que tienen el mismo marco de lectura en dirección 3' o 5'.

Del producto de la PCR, 12 μ L del DNA fueron colocados en un tubo eppendorf de 0.5 mL, se agregaron 0.5 μ L de la enzima *TaqIB* (Boehringer de 10 U/ μ L) y 1.0 μ L del amortiguador 10X de la enzima (Apéndice D). Se homogenizó y se incubó por 3 h a 60°C. Ésta enzima de restricción es específica para la secuencia palindrómica T/CGA.

e) Verificación del genotipo

El tamaño de los productos de la digestión fue identificado, mediante electroforesis en un minigel de agarosa al 3% con buffer TBE 0.5X (apéndice E). Si en una muestra, la enzima generó fragmentos de 350 y 180 pb se asignó el genotipo B1, y si la enzima no generó ningún fragmento se le asignó el genotipo B2. El genotipo se documentó mediante fotografía de cada gel.

VII) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación de las características antropométricas y fisiológicas entre los grupos, se hizo por Análisis de Varianza paramétrico (ANOVA), empleando la prueba de LSD (least significant difference) para conocer la diferencia entre los grupos. Se empleó un análisis de covarianza de un factor (ANCOVA) para ajustar los datos de las variables confusoras como: obesidad, índice de masa corporal y edad. De igual forma, se hizo un ANCOVA de un factor separando por sexo, ajustando las mismas variables confusoras. Con el objeto de determinar la asociación del polimorfismo *Taq1B* con las prevalencias de los distintos factores de riesgo, se empleó la prueba de χ^2 . Se calculó el riesgo relativo de hipoalfalipoproteinemia para cada genotipo. Todas las variables se expresaron como media \pm EE. 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 hizo con el paquete estadístico SPSS versión 9.0.

VIII) RESULTADOS

La figura 7 ilustra el patrón electroforético característico de los productos de la restricción del intrón 1 del gen de la CETP. En la muestra 1 y 7 se observa la migración del fragmento de restricción obtenido en un homocigoto B1B1, una banda de 350 pb y otra de 180 pb, producto de la digestión de ambos alelos con la enzima *Taq1B*; en las muestras 2, 3, 5 y 6 se observa un heterocigoto B1B2, bandas de 530, 350 y 180 pb, la enzima reconoció el sitio de corte solamente en uno de los dos alelos, mientras que en la muestra 4 se observa un heterocigoto B2B2, una banda de 530 pb como resultado de que la enzima no reconoció ningún sitio de corte en los alelos. En el carril 9 se depositó el estándar de DNA con el cual se determinó el tamaño de los fragmentos de restricción.

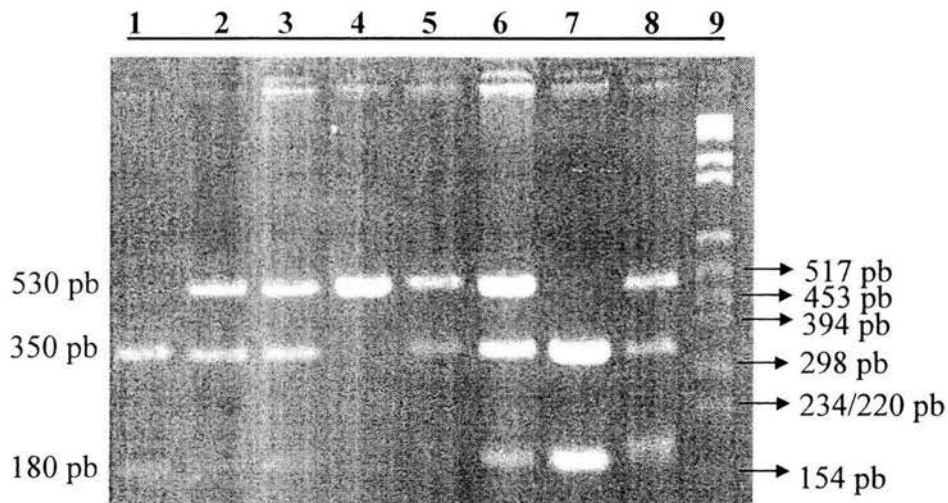


Figura 7. Electroforesis al 3% en gel de agarosa. Las bandas corresponden a los productos del amplificado de la PCR y de la restricción de los mismos por la enzima *Taq1B*.

Las características antropométricas y fisiológicas de los 219 sujetos agrupados por sus genotipos de la *CETP-Taq1B* se muestran en la tabla 4. No se encontraron diferencias estadísticas en los valores promedio de la edad, IMC, relación cintura/cadera, presión arterial sistólica y diastólica, entre los tres genotipos. La frecuencia de los alelos B1 y B2 en el grupo total fue de 0.48 y 0.52, respectivamente.

Tabla 4. Características generales de los sujetos estudiados por genotipo *CETP-Taq1B*.

	Genotipo			p
	B1B1	B1B2	B2B2	
N	32	145	42	ns
Edad (Años)	42.3±1.6	40.0±0.8	39.4±1.5	ns
IMC (Kg/m ²)	27.0±0.8	25.7±0.3	26.6±0.6	ns
P. cin/cad (cm)	0.84±0.07	0.83±0.07	0.82± 0.07	ns
PAS (mm Hg)	114.9±2.6	114.0±1.0	111.1±1.8	ns
PAD (mm Hg)	75.8±1.6	77.2±0.8	74.5±1.5	ns

Los valores expresan la media±EE. IMC: índice de masa corporal; P. cin/cad: perímetro cintura/cadera; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica. El valor de p fue calculado mediante un análisis de varianza.

En cuanto a la determinación de los lípidos, estos se mantuvieron por debajo del margen de error que establece el CDC que es menos del 4% de variación, de tal forma que los coeficientes de variación intra ensayo para CT, TG, y C-HDL fueron 1.1%, 0.62%, y 1.14%, y los coeficientes de variación inter-ensayo de 3.05%, 2.5%, y 3.7% respectivamente. En la tabla 5, se muestran las concentraciones de lípidos y lipoproteínas por genotipo. Los valores medios de CT, C-LDL y de C-HDL tienden a ser más elevados en los portadores del genotipo B2, pero solo la concentración de CT y el C-LDL alcanzaron diferencias significativas.

Tabla 5. Lípidos y lipoproteínas de los sujetos estudiados por genotipo CETP-*Taq1B*.

	Genotipo			p
	B1B1	B1B2	B2B2	
N	32	145	42	
TG (mg/dL)	111.0±2.1	111.8±0.8	104.6±1.8	ns
CT (mg/dL)	165.2±5.4	180.3±2.5	190.5±4.7	0.014*
C-LDL (mg/dL)	108.1±5.1	118.1±2.4	125.9±4.4	0.03*
C-HDL (mg/dL)	41.1±1.9	44.6±0.9	45.6±1.6	ns

Los valores expresan la media±EE. TG: Triglicéridos; CT: Colesterol total; C-LDL, Colesterol de lipoproteínas de baja densidad; C-HDL, Colesterol de lipoproteínas de alta densidad. *ANCOVA ajustada por IMC, TG y sexo.

El perfil de lípidos y lipoproteínas por genotipo de la *Taq1B* por sexo se muestra en la Tabla 6. Se encontró que en los tres genotipos, las concentraciones de CT, TG y C-LDL fueron menores en las mujeres que en los hombres. Después de controlar por IMC y TG el análisis de ANCOVA mostró diferencias significativas en CT y C-LDL sólo en las mujeres ($p<0.05$), mientras que el colesterol de HDL fue igual en los tres genotipos. Aunque la concentración de colesterol de esta lipoproteína fue mayor en las mujeres que en los hombres, entre los genotipos de ambos sexos no hubo diferencias significativas.

Tabla 6. Valores medios de lípidos y lipoproteínas según sexo y genotipo CETP-*Taq1B*.

	Mujeres				Hombres			
	B1B1	B1B2	B2B2	p	B1B1	B1B2	B2B2	p
n	23	109	34		9	36	8	n
TG	105.6±9.5	105.1±6.3	101.3±7.4	ns	155.0±10.9	151.8±2.7	140.1±13.2	ns
CT	163.3±6.5	179.3±3.4	187.5±5.8	0.01*	193.8±4.2	186.0±1.1	198.4±5.1	ns
C-LDL	104.9±5.5	116.9±3.0	124.8±4.9	0.02*	132.5±3.6	123.1±0.8	135.0±4.4	ns
C-HDL	41.5±2.0	45.6±1.2	46.5±1.7	ns	36.3±3.5	38.8±1.7	39.3±1.4	ns

Los valores expresan el promedio \pm EE en mg/dL. TG: triglicéridos; CT: Colesterol total; C-LDL: Colesterol de lipoproteínas de baja densidad; C-HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad. El valor de p fue calculado mediante un análisis de covarianza ajustado por IMC y TG.

Para conocer si el genotipo se encontraba asociado a alguno de los otros FRC, se hicieron cohortes entre las variables; los criterios para hacer éstos cohortes fueron tomados de un estudio previo llevado a cabo en la población mexicana⁵², quedando de la siguiente manera: hipertensión arterial (HTA) fue definida como aquellas personas que tuvieran una presión arterial sistólica/diastólica mayor de 140/90 mmHg; la obesidad si el IMC fue mayor de 25 kg/m²; diabetes mellitus (DM) con una glucosa mayor de 120 mg/dL; hipoalfalipoproteinemia (HA) con una concentración de C-HDL menor de 35 mg/dL; hipertrigliceridemia (HT) que tuvieran una concentración triglicéridos mayor de 200mg/dL; e hipercolesterolemia (HC) que tuvieran una concentración C-LDL mayor de 160 mg/dL. Las prevalencias de factores de riesgo por genotipo en el grupo total se muestran en la tabla 7. El factor de riesgo coronario más frecuente en los tres genotipos fue la OB, le siguió la HA y después la HT. Dado que en unos factores de riesgo existieron menos de 5 individuos por genotipo, se excluyeron para el análisis estadístico, de tal forma que solo la OB y la HA fueron tomados en cuenta.

Tabla 7. Prevalencia de factores de riesgo según genotipo de CETP-Taq1B.

Genotipo	HTA	OB	DM	HA*	HT	HC
B1B1	9	37	3	34	12	9
B1B2	1	31	4	22	11	10
B2B2	2	40	2	11	4	11

Los datos representan el porcentaje de sujetos por genotipo. HTA: hipertensión arterial; OB: obesidad, DM: diabetes mellitus; HA: hipoalfalipoproteinemia, HT: hipertrigliceridemia, HC:hipercolesterolemia (C-LDL >160 mg/dL). * $\chi^2=10.9$, $p<0.05$.

El análisis de χ^2 realizado para investigar si existían diferencias en las prevalencias de los FRC por genotipo, mostró que sólo en la HA hubo diferencias significativas ($\chi^2=10.92$, $p<0.05$) figura 8A. En la figura 8B se muestra la prevalencia después de excluir a los obesos e hipertrigliceridémicos (HA primaria). En ambos casos la tasa de HA fue mayor en los homocigotos B1 que en los heterocigotos y homocigotos B2 (21% vs. 9 y 8% respectivamente) ($\chi^2=7.36$, $p<0.05$).

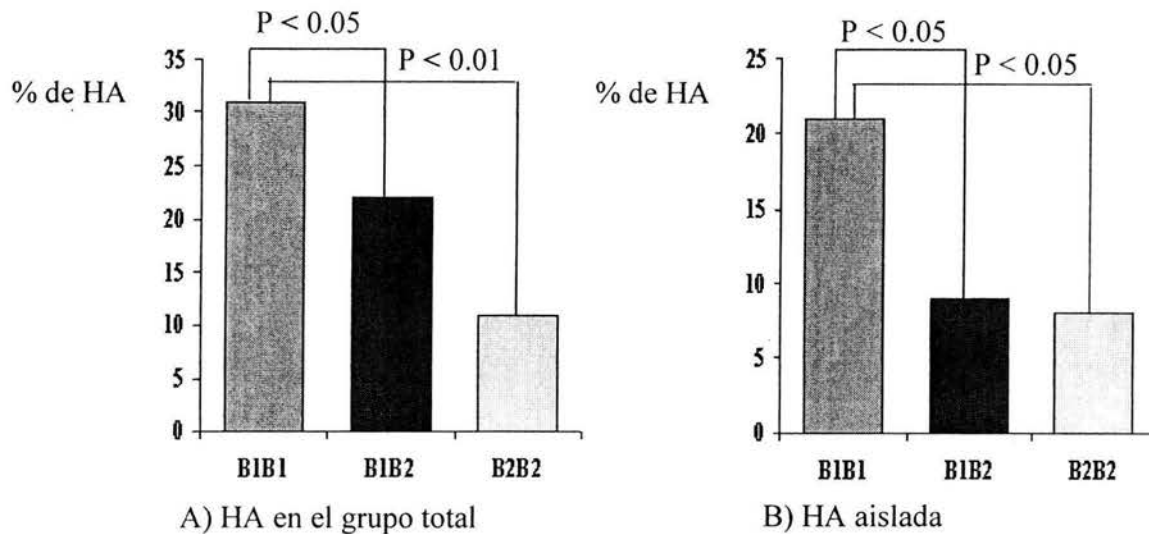


Figura 8. Hipoalfalipoproteinemia por genotipo en adultos del Sur de la Ciudad de México.

Por otra parte, ya que los andrógenos, tienen efecto sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas, principalmente sobre el C-HDL, en los siguientes análisis, se excluyeron las mujeres con edad mayor de 50 años por que se considero que pudieran sesgar la interpretación de los resultados. También ya que el número de sujetos del sexo masculino que aceptó participar en el estudio fue menor que el de las mujeres, se excluyeron a todos los hombres. Por esta razón el número de mujeres estudiadas fue de 144, 20 homocigotos B1, 94 heterocigotos, y 30 homocigotos B2 con una frecuencia alélica de 0.465 y 0.533 para B1 y B2, muy similares a las encontradas en el grupo total (0.489 y 0.518).

Los valores promedio de colesterol total y C-LDL de las 144 mujeres, también fueron similares a los del grupo total, de hecho conservaron las diferencias significativas ($p < 0.01$) y ($p < 0.03$) respectivamente. En relación a las concentraciones de C-HDL, se mantuvo la misma distribución, es decir menor concentración en las portadoras del alelo B1B1 con respecto a los alelos B1B2 y B2B2, sin alcanzar una diferencia estadísticamente significativa, Tabla 8.

Tabla 8. Lípidos y lipoproteínas en mujeres menores de 50 años por genotipo de CETP-*Taq1B*.

VARIABLE	Genotipo			p
	B1B1	B1B2	B2B2	
N	20	94	30	n
TG (mg/dL)	108.7±13.8	100.6±6.1	100.5±11.1	ns
CT (mg/dL)	160.5±6.7	175.1±3.0	185.2±5.4	0.01
C-LDL (mg/dL)	101.8±6.4	113.6±2.8	122.5±4.9	0.03
C-HDL (mg/dL)	42.4±2.6	45.2±1.2	46.3±2.0	0.47

Los valores expresan el promedio \pm EE. TG: triglicéridos; CT: Colesterol total; C-LDL: Colesterol de lipoproteínas de baja densidad; C-HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad. El valor de p fue calculado mediante un análisis de covarianza ajustando por IMC y TG.

Una prueba de χ^2 se realizó para saber si existían diferencias entre las prevalencias de hipoalfalipoproteinemia (25%, 18% y 12%) para los genotipos B1B1, B1B2 y B2B2, se pudo observar que sólo se presentó una tendencia marginal ($\chi^2= 5.6$ $p= 0.059$). Por otra parte cuando se calculó el riesgo relativo para HA, se observó que aún con una frecuencia alélica menor del genotipo B1B1, el riesgo relativo de desarrollar hipoalfalipoproteinemia fue de 2.3 veces mayor que el del genotipo B2B2 ($p = ns$) Figura 9.

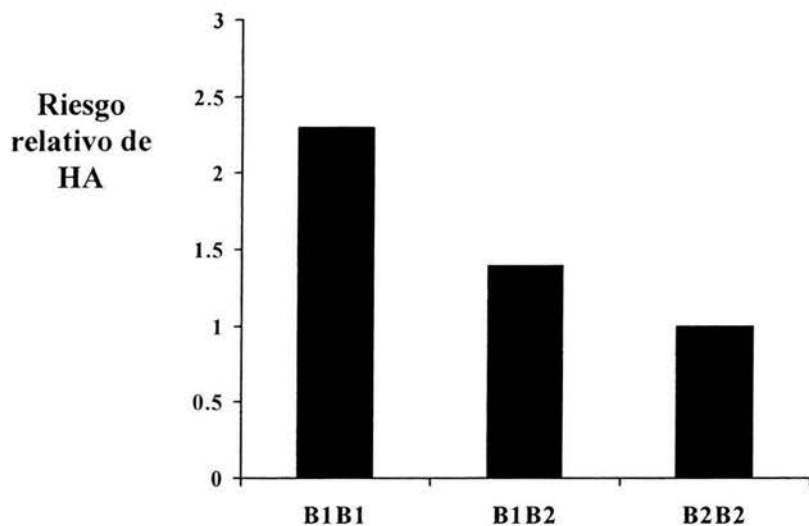


Figura 9. Riesgo relativo de hipoalfalipoproteinemia en mujeres menores de 50 años por genotipo CETP-*Taq1B*.

IX) DISCUSIÓN

En México, una dislipidemia muy frecuente que se asocia con el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria son los valores bajos de colesterol de HDL o también llamada hipoalfalipoproteinemia⁴⁷. Las causas primarias de esta dislipidemia no se conocen totalmente, sin embargo, algunos estudios indican que los factores genéticos son elementos claves para desarrollar HA⁵³. Por otra parte, también existen causas secundarias que pueden desarrollar esta enfermedad, como la hipertrigliceridemia, la obesidad y el sedentarismo^{18, 54}. Entre los factores metabólicos que alteran los valores de colesterol en las HDL destaca la CETP⁵⁵. Ésta glicoproteína altamente polimórfica cuya función es transferir ésteres de colesterol de las HDL a las lipoproteínas que contienen apo-B mediante el transporte reverso del colesterol. En el humano, regula los valores de C-HDL¹¹. Un aumento en la actividad de la enzima, determinada por variantes en su gen, provoca una disminución en el colesterol de HDL.^{31, 40}. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue conocer la distribución del polimorfismo del intrón 1 del gen de la CETP, en una muestra obtenida en población abierta del Sur de la Ciudad de México e investigar cual es su relación con las concentraciones de C-HDL, partiendo de la hipótesis de que, como en otras poblaciones, el polimorfismo pudiera estar asociado con la concentración del C-HDL, (el alelo B1 con valores bajos y el B2 con valores altos); por lo que quizá entonces el alelo B1, en nuestra población se encuentre con mayor frecuencia y explique, al menos en parte, la hipoalfalipoproteinemia que caracteriza a la población mexicana⁴⁷.

Dos métodos frecuentemente usados en el estudio de polimorfismo de la CETP-*Taq1B* son los descritos por Kuivenhoven⁴² y Fumeron⁵¹. Para descartar la posibilidad de que los resultados de nuestra serie dependieran del método, se decidió comparar los iniciadores usados por ambos autores. Los resultados de ambos métodos tuvieron una concordancia del 100% (no mostrado). Por lo tanto, nuestros resultados son comparables con cualquiera de los datos informados en la literatura,

sin embargo, y debido a que con el método utilizado por Fumeron se obtuvo una mejor resolución de las bandas, se decidió utilizar éste método.

Las frecuencias alélicas del polimorfismo CETP-*Taq1B*, encontradas en las muestras de sujetos de la Ciudad de México difirieron de las reportadas en otras poblaciones si se compara con previos estudios llevados acabo en caucásicos^{56, 57}, griegos⁵⁶, y orietales⁴⁵. La frecuencia del alelo B1 en nuestra población está disminuida y la del alelo B2 aumentada (tabla 9). Según nuestra hipótesis, en nuestra población esperábamos encontrar una mayor frecuencia del alelo B1 que explicara los valores bajos de colesterol en las HDL.

Tabla 9. Frecuencias alélicas en mujeres de otras poblaciones y las obtenidas en éste estudio.

POBLACIÓN	FRECUENCIA ALÉLICA	
	B1	B2
Finlandia ⁵⁷ (n=111)	0.541	0.459
Italia ⁵⁶ (n=157)	0.565	0.434
Grecia ⁵⁶ (n=164)	0.516	0.482
Taiwan ⁴⁵ (n=274)	0.520	0.480
México (n=144)	0.465	0.533

El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg calculado para el gen de la CETP en éste trabajo fue significativo ($\chi^2= 12.2$ $p < 0.001$), e indica que en nuestra población este gen esta en desequilibrio genético. Es bien sabido que la Ciudad de México se caracteriza por tener una mezcla de varios grupos étnicos que provienen de diferentes partes de la República Mexicana, y que el mestizaje relativamente reciente, hace que el aporte de cargas genéticas sea diverso. En este estudio las muestras fueron tomadas de sujetos del Distrito Federal que aceptaron participar voluntariamente, por lo que pensamos que el desequilibrio encontrado en este estudio, probablemente se deba a la diversidad de los diferentes grupos étnicos provenientes del interior de la república al centro del país, y al mestizaje. Resultados similares al nuestro en el que la mezcla de varios grupos étnicos

provenientes de varias provincias causan un desequilibrio en el gen de la CETP han sido informados en italianos⁵⁶.

En comparación con otros estudios en los que el CT y C-LDL son similares en los tres genotipos³⁹⁻⁴¹, en este trabajo encontramos diferencias significativas en los valores medios de CT, y C-LDL entre las mujeres, estos resultados confirman que en los portadores del alelo B1 de la CETP, la tasa de transferencia de ésteres de colesterol de HDL a las VLDL e IDL es mayor que en los portadores del alelo B2. En los hombres, los resultados fueron diferentes, probablemente por el número pequeño de individuos estudiados, además de que existen evidencias en la literatura que indican que el polimorfismo *Taq1B*, se acentúa más en las mujeres que en los hombres^{41,43}.

Estudios realizados en pacientes diabéticos tipo 1⁴³, tipo 2^{58, 59}, sujetos con síndrome plurimetabólico⁶⁰, con enfermedad arterial coronaria⁴⁵, así como en sujetos sanos agrupados por sus concentraciones de HDL^{41,42}, se ha observado una clara influencia del polimorfismo CETP-*Taq1B* sobre las concentraciones de C-HDL. Sin embargo, la falta de asociación entre C-HDL y el genotipo CETP-*Taq1B* también ha sido reportada por otros autores^{57,61}.

En estudios realizados en poblaciones de origen caucásico, las diferencias entre las concentraciones de C-HDL por genotipo de la *Taq1B* son significativas, llegando a presentar diferencias de hasta 17 mg/dL entre los homocigotos B1 y B2 (55mg/dL vs 72 mg/dL), respectivamente⁵⁷. En nuestro estudio, la concentración de C-HDL también fue menor en los portadores del alelo B1 con respecto a los portadores del alelo B2, aunque sin significado estadístico, la diferencia con otros grupos étnicos pudiera deberse a que en nuestra población el margen de diferencia entre los valores medios de C-HDL por genotipo fue de tan solo 4 mg/dL (41mg/dL en B1 y 45 mg/dL en B2). Ambas cifras son de los valores más bajos informados entre las poblaciones (figura 10).

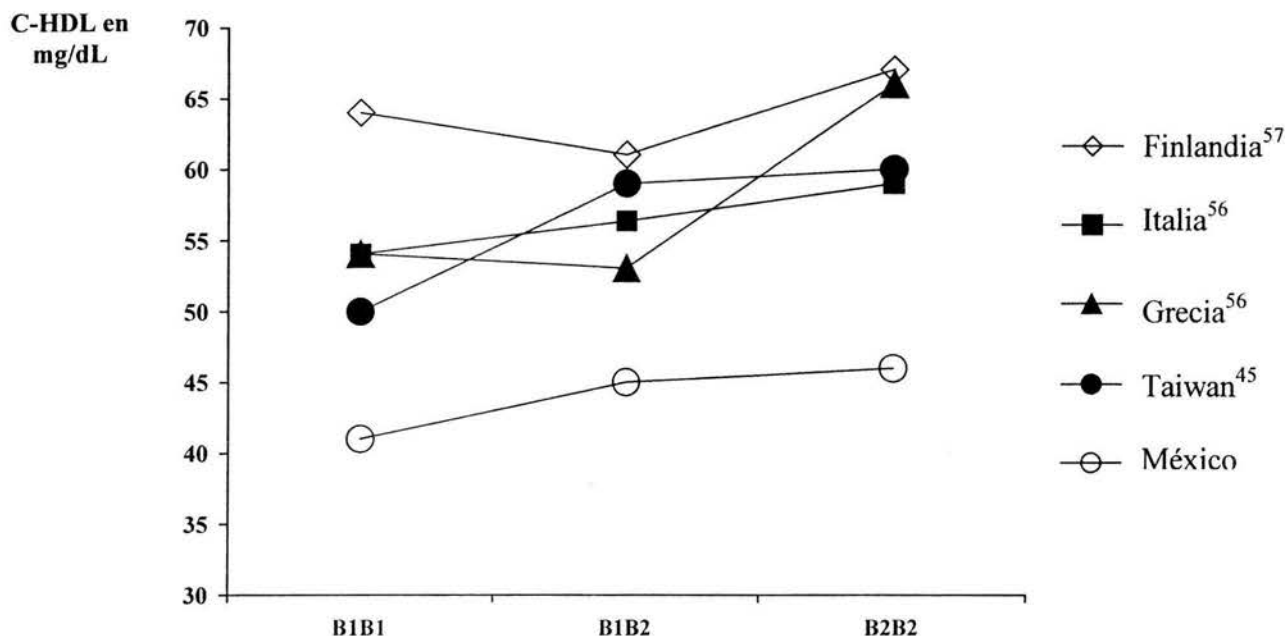


Figura 10. Asociación del genotipo CETP-*Taq1B* con los valores de C-HDL en diferentes poblaciones.

Algunos datos adicionales y de interés encontrados en las muestras estudiadas, fue la alta prevalencia de factores de riesgo (tabla 7). Aunque este no era el objetivo que se perseguía en el estudio, en éste trabajo se pudo observar que el sobrepeso (IMC de 25-30 kg/m²) fue de 45%, y la obesidad (IMC>30 kg/m²) fue de 34%. Estos datos son muy altos comparados con estudios previos realizados en población urbana de México^{46, 47}. Por otra parte, cuando se analizaron las frecuencias de algunos factores de riesgo por genotipo, se observó que sólo la HA presentó diferencias significativas. Este resultado apoya la hipótesis de que el polimorfismo *Taq1B* de la CETP pudiera ser uno de los principales factores de riesgo en nuestra población. De hecho cuando se calculó el riesgo relativo para cada genotipo, se observó que el homocigoto B1, confiere 2.3 veces más riesgo de HA (figura 9).

El mecanismo mediante el cual el polimorfismo *Taq1B* influye sobre las concentraciones de C-HDL se desconoce, sin embargo, varios autores indican que dado que éste polimorfismo se encuentra asociado tanto con la concentración como con la actividad de CETP, la explicación más plausible es que este polimorfismo esté en unión de desequilibrio con alguna mutación funcional en la región reguladora del gen de la CETP^{39 43}. Es decir que el alelo B1 siempre va a estar presente, solo si existe otro elemento regulador aún desconocido, que este promoviendo la síntesis de CETP, por lo que el polimorfismo *CETP-Taq1B*, que se encuentra en un intrón 1, pudiera ser un reflejo de lo que esta pasando en otro lugar adyacente a este gen. Para poder comprobar esto es necesario hacer estudios de haplotipos, ya que como se dijo anteriormente ésta proteína tiene varios sitios polimórficos, por lo que cabe la posibilidad de que pudieran estar ligados entre sí algunos de estos polimorfismos.

Aún y cuando el alelo B1 se encontró asociado a valores bajos de C-HDL, los resultados observados en el presente trabajo nos hace pensar que existen otros factores de tipo ambientales ó genéticos, ó la suma de ambos, además del polimorfismo de la CETP que pudieran explicar la tendencia a los valores bajos de C-HDL presentes en nuestra población.

Existe evidencias de que los efectos que tiene este polimorfismo sobre los valores del colesterol de HDL pueden ser enmascarados por factores ambientales, ya que en el estudio llevado a cabo por Fumeron⁵¹, reportó que el significado estadístico encontrado entre C-HDL y el genotipo *Taq1B* en su población, desapareció por el sólo hecho de dividir a su población en fumadores de no fumadores; aunque en su estudio él no da una explicación a los resultados encontrados, sí pone de manifiesto que posiblemente exista un desarrollo metabólico anormal que pudiera enmascarar o cancelar el efecto genético sobre el colesterol de HDL. En nuestro trabajo no fue posible controlar todas las variables confusoras para observar el efecto aislado del polimorfismo, no se tomó en cuenta la dieta, el hábito de fumar y el estilo de vida, variables de gran peso, si se tiene en cuenta que en la población de la Ciudad de México la dieta está compuesta principalmente por grasas

saturadas y azúcares compuestos, además de que el estilo de vida es generalmente sedentaria^{46, 62}. No obstante, sí se hizo un ajuste de variables que pudieran sesgar los resultados, por ejemplo, la concentración de triglicéridos y el IMC, los cuales se sabe modifican directamente los valores de C-HDL.

En México, éste trabajo es el primero en tratar de encontrar factores genéticos que estén asociados a las bajas concentraciones de C-HDL, aunque en este estudio cumplió con los objetivos que se trazaron al comienzo del mismo, existen aún más cosas por investigar, por ejemplo, se sabe de la relación inversa que existe entre las concentraciones de TG y C-HDL, y cómo estas variables bioquímicas pueden ser influenciadas por la actividad y la concentración de CETP, haciéndose más evidente en personas obesas⁶⁰; (ya que es en el tejido adiposo donde se lleva a cabo la mayor síntesis de CETP). Pues bien, en nuestro trabajo se observó en ambos sexos una prevalencia de obesidad central (Cin/Cad >0.8 en mujeres y Cin/Cad >0.9 en hombres) y una marcada relación inversa entre las concentraciones de TG y C-HDL ($p < 0.001$) Estas observaciones nos llevan a pensar que probablemente en esta población, la actividad CETP podría estar jugando un papel muy importante en la distribución de los lípidos entre las HDL y las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Por lo que sugerimos para futuros trabajos medir la actividad CETP.

Además de la CETP, existen varias proteínas que están directamente relacionadas con las HDL y que sería interesante estudiar, tales como la LCAT, la PLTP y la LH han mostrado que pueden alterar la composición y concentración de las HDL^{10, 54}, además de los factores genéticos que promueven de forma indirecta la síntesis de HDL pequeñas, como es el caso de los elementos PPARS⁶³.

X) CONCLUSIÓN

La frecuencia del alelo B1 fue menor que la reportada en poblaciones caucásicas. Aunque no encontramos asociación significativa de los genotipos con las concentraciones bajas de C-HDL, probablemente por el tamaño de la muestra, la relación entre los valores de C-HDL y el genotipo *CETP-Taq1B* siguen el mismo patrón que en las poblaciones caucásicas, pero a valores más bajos de C-HDL. Nuestros resultados confirman que el polimorfismo del gen de la *CETP-Taq1B* no explica los valores bajos de C-HDL en nuestra población, sin embargo, vale la pena recalcar que aunque el homocigoto B1 tiene 2.3 veces más el riesgo de ser HA, y no es el principal determinante de la concentración de C-HDL en la población de la Ciudad de México.

La variación polimórfica del intrón 1 del gen de la *CETP*, parece ser uno de los determinantes en las concentraciones de CT y C-HDL en las mujeres de la Ciudad de México.

XI) APÉNDICES

APÉNDICE A

SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA

SOLUCIÓN PARA LA LÍISIS DE LAS CÉLULAS ROJAS (SLR)

Para un litro 20 X

50 mL de Tris 2M =12.12 g.

50 mL de MgCl₂ 1M =10.16 g.

100 mL de NaCl 1M = 5.78 g.

Ajustar el pH a 7.6 y aforar a 1L.

Para preparar 1L 1X

50 mL de SLR (20 X) aforar a 1000 mL con H₂O.

BUFFER DE PROTEINASA K (5 X)

Para 100 mL

0.375 M de NaCl = 2.19g.

0.12 M de EDTA =4.46g.

Ajustar el pH a 8 y aforar a 100 mL con H₂O.

Filtrar con un filtro de celulosa.

PROTEINASA K

Ajustar a 10 mg/mL con H₂O inyectable.

SDS 20 %

NaCl 5 M 14.6 g en 50 mL

APÉNDICE B

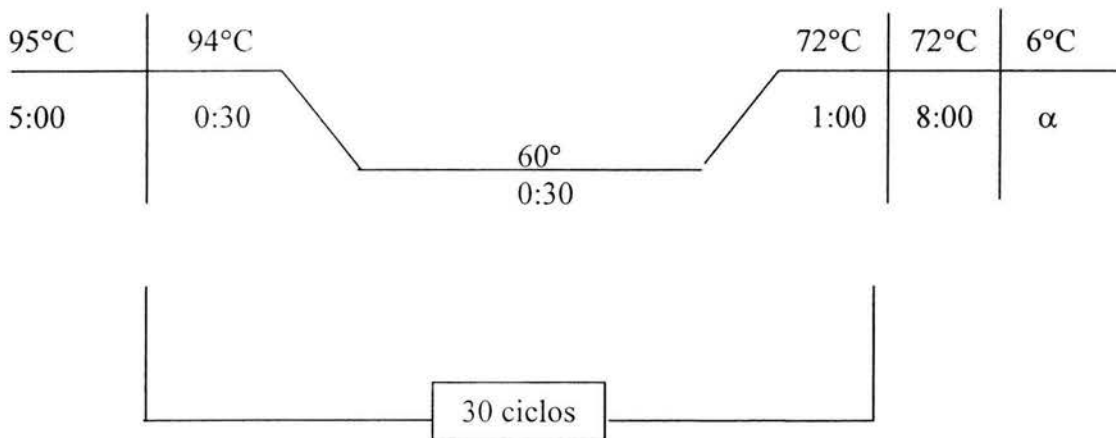
MEZCLA PARA EL AMPLIFICADO DE CETP

SOLUCIÓN (mezcla del amplificado)	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
dNTPs 5 mM/ μ L	2 μ L	200 μ M
Buffer 10X	5 μ L	1 X
MgCl ₂ 25 mM	3 μ L	1.5 mM
Iniciador L3' 10 pM/ μ L	5 μ L	50 pM
Iniciador U5' 10 pM/ μ L	5 μ L	50 pM
H ₂ O	27.5 μ L	
Taq pol. (5 U/ μ L)	0.5 μ L	2.5 U
DNA (400 ng/ μ L)	2 μ L	800 ng
Vol. Total	50 μ L	

NOTA: El Buffer y el MgCl₂ vienen con la enzima Taq-Polimerasa y por lo tanto son los que se usan. Es importante agitar estos dos reactivos antes de agregarlos a la mezcla.

El volumen del agua va a depender de como están ajustadas las concentraciones de los reactivos y el DNA, por lo que puede ser modificado. El cálculo está diseñado para un volumen final 50 μ L por muestra.

Programa del termociclador



APENDICE C

GEL DE AGAROSA 1.5 % (37 mL)

SOLUCIONES

I.Z.T.

BUFFER	CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK (1000 mL)
Tris-borato (TBE 5X)	54 g tris base 27.5 g ácido bórico 20 mL 0.5M EDTA pH 8.0 (sólo el EDTA)
Bromuro de etidio (100 mL)	0.5 mg en H ₂ O desionizada
Azúl de bromofenol (2 mL)	1 mL de glicerol (50%) 40µL 0.5 M EDTA pH 8.0 (10 mM) 5 mg azul de bromofenol (0.25%) 5 mg de xylene lyanol FF (0.25%) Esterilizar por filtración
Marcador de DNA	φx174 Hae III
TBE 0.5 X (300 mL)	30 mL de buffer TBE 5 X aforar a 300 mL con agua destilada.



Procedimiento: En un matr az erlenmeyer de 250 mL, se depositaron 0.55 g de agarosa de la marca Gibco (grado biología molecular), se le adicionaron 3.7 mL de buffer TBE 5 X y se llevó a un volumen de 37 mL con H₂O desionizada. Se calentó en un horno de microondas hasta que la agarosa se disolvió por completo. Se dejo enfriar poco tiempo cuidando que no llegue a polimerizar. Se vació en el molde de la cámara e inmediatamente se colocó el peine de 1.5 mm de ancho. Se dejó polimerizar (aproximadamente 20 minutos). Una vez polimerizado el gel, se retir  el peine, se llenó la cámara con solución amortiguadora TBE 0.5 X, se colocarán 10 µL de muestra por pozo

previamente diluida con azul de bromofenol (3 μ L) que se utilizó como marcador de migración. En uno de los pozos se depositaron 5 μ L (dilución 1:10 con azul de bromofenol) del marcador de DNA con fragmentos de 154 a 2150 pares de bases. Las muestras se migaron durante 20 minutos a 80 V. Después de la electroforesis, el gel de agarosa se colocó en la solución de bromuro de etidio (BE), para que las moléculas de BE se intercalen a los nucleótidos de DNA y produzcan fluorescencia al ser iluminadas con luz ultravioleta (UV) señalando así los sitios en el gel donde migraron los fragmentos de DNA.

Nota. EL libro de Maniatis de biología molecular recomienda usar el buffer TBE para geles de agarosa a una concentración de 0.5 X, tanto para preparar el gel como para el buffer de corrida.

APÉNDICE D

Amortiguador de la enzima *TaqI*

Tris -HCL	10 mmol/L
NaCl	100 mmol/L
MgCL ₂	5 mmol/L
2-mercaptoethanol	1 mmol/L
ajustar a pH 8	

APÉNDICE E

GEL DE AGAROSA 3 % (37 mL)

SOLUCIONES

BUFFER	CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK (1000 mL)
Tris-borato (TBE 5X)	54 g tris base 27.5 g ácido bórico 20 mL 0.5M EDTA pH 8.0 (sólo el EDTA)
Bromuro de etidio (100 mL)	0.5 mg en H ₂ O desionizada
Azúl de bromofenol (2 mL)	1 mL de glicerol (50%) 40µL 0.5 M EDTA pH 8.0 (10 mM) 5 mg azul de bromofenol (0.25%) 5 mg de xylene lyanol FF (0.25%) Esterilizar por filtración
Marcador de DNA	φx174 Hae III
TBE 0.5 X (300 mL)	30 mL de buffer TBE 5 X aforar a 300 mL con agua destilada.

Procedimiento: En un matr az erlenmeyer de 250 mL, se depositaron 1.1 g de agarosa de la marca Gibco (grado biología molecular), se le adicionaron 3.7 mL de buffer TBE 5 X y se llevó a un volumen de 37 mL con H₂O desionizada. Se calentó en un horno de microondas hasta que la agarosa se disolvió por completo. Se dejo enfriar poco tiempo cuidando que no llegue a polimerizar. Se vació en el molde de la cámara e inmediatamente se colocó el peine de 1.5 mm de ancho. Se dejó polimerizar (aproximadamente 20 minutos). Una vez polimerizado el gel, se retir  el peine, se llenó

la cámara con solución amortiguadora TBE 0.5 X, se colocaron 10 μ L de muestra por pozo previamente diluida con azul de bromofenol (3 μ L) que se utilizó como marcador de migración. En uno de los pozos se depositaron 5 μ L (dilución 1:10 con azul de bromofenol) del marcador de DNA con fragmentos de 154 a 2150 pares de bases. Las muestras se migaron durante 1:20 minutos a 80 V. Después de la electroforesis, el gel de agarosa se colocó en la solución de bromuro de etidio (BE), para que las moléculas de BE se intercalen a los nucleótidos de DNA y produzcan fluorescencia al ser iluminadas con luz ultravioleta (UV) señalando así los sitios en el gel donde migraron los fragmentos de DNA. Si en una muestra, la enzima generó fragmentos de 350 y 180 pb se asignó el genotipo B1, y si la enzima no generó ningún fragmento se le asignó el genotipo B2. El genotipo se documentó mediante fotografía de cada gel.

Nota. EL libro de Maniatis de biología molecular recomienda usar el buffer TBE para geles de agarosa a una concentración de 0.5 X, tanto para preparar el gel como para el buffer de corrida.

XII) REFERENCIAS

1. Aguilar SCA, Gómez PFG. Lipoproteínas y aterogénesis. 1. Metabolismo normal de las lipoproteínas. *Rev INNSZ* 1989; 2:22-28.
2. Marcovina SM, Koschinsky ML. Lipoprotein(a) as a factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 82:57-66.
3. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982; 23: 97-104.
4. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, kato N, Ebihara A, Hamada Ch, Kurihara Y, Shindo T, Oh-hashii Y, Yasaki Y. Evidence for association between paraoxonase gene polimorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2000; 149:435-442.
5. Ritsch A, Drexel H, Amann FW, Pfeifhofer Ch, Patsch JR. Deficiency of cholesteryl ester transfer protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3433-3441.
6. Jiang X, Bruce C, Mar J, Lin M, Ji Y, Francone OL, Tall AR. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest* 1999; 103:907-914.
7. Tahvanainen E, Jauhiainen M, Funke H, Vartiainen E, Sundvall J, Ehnholm Ch. Serum phospholipid transfer protein activity and genetic variation of the PLTP gene. *Atherosclerosis* 1999; 146:107-115.
8. Ganong W. Manual de fisiología médica. Ed. El manual moderno, Méx. D.F. 1995; 6-52.
9. Ahumada AM. Transporte de lípidos séricos: metabolismo de las lipoproteínas. En Zorrilla E. *Lípidos séricos en la clínica*. 2da Ed. Interamericana, México 1989; 46-57.
10. Rander J. Daniel, Maugeais Cyrille. Genes influencing HDL metabolism: new perspectives and implications for atherosclerosis prevention. *Molecular medicine today*, april 2000.

11. Fielding C, Fielding P. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36:211-228.
12. Lozano CO. Importancia de las hiperlipidemias en la sociedad actual. En Barranco GJ, Guadalajara B JF. Importancia de los lípidos en la medicina contemporánea. Instituto Científico Lakeside. Ed. Médica panamericana. 1990; 15-25.
13. Thompson GR. A handbook of hiperlipidemia, 2^a edición, Ed. Merck, and Co. Inc. USA, 1994; 57-64.
14. Ahumada AM. Lipoproteínas y su papel en la patogénesis de la aterosclerosis. En Barranco GJ, Guadalajara B JF. Importancia de los lípidos en la medicina contemporánea. Instituto Científico Lakeside. Ed. Medica panamericana. 1990: 26-40
15. Manninen VL, Tenkanen P, Koskinen JK, Huttunen J. Effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki heart study: Implication for treatment. *Circulation* 1992; 85:37-45.
16. Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and Mortality. 30 Years of Follow-up from of Framinham Study. *JAMA* 1987; 257:2176-2180
17. Assmann G, Schulte H. Relation of High density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992; 70:733-7.
18. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241
19. Ahumada AM. Patogénia de la aterosclerosis. En Posadas Romero C. Dislipidemias y aterosclerosis. Ed. Interamericana.1995; 1-16.
20. Cueto GL, Barrios R, Pérez GG, Prevención de la aterosclerosis coronaria: Conceptos patológicos y básicos. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 1987; 57:331-336.
21. INEGI/SSA/DGEI. 1997-1998
22. Tall AR. Cholesterol ester transfer protein. *J Lipid Res* 1993; 34:1255-1274

23. Tall AR. Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64:235-257.
24. Swensson TL, Borcia RW, Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein has binding sites for neutral lipids and phospholipids. *J Biol Chem* 1988; 263:5150-5157.
25. Morton RE. Specificity of lipid transfer protein for molecular species of cholesteryl ester. *J Lipid Res* 1986; 27:523-529.
26. Nishida HI, Arai H, Nishida T. Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by charge in characteristics of plasma lipoproteins. *J Biol Chem* 1993; 268:16352-16360.
27. Masucci-Magoulas L, Moulin P, Jiang XC, Richardson H, Walsh AM, Breslow JL, Tall A. Decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increase high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CET transgenic mice. *J Clin Invest* 1995; 95:1587-1594.
28. Faust RA, Tollefson JH, Chaii A, Albers JJ. Regulation of LTP-1 secretion from human monocyte-derived macrophages by differentiation and cholesterol accumulation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1042:404-409.
29. Iglesias A, Montelongo A, Herrera E, Lasuncion MA. Changes in cholesteryl ester transfer protein activity during normal gestation and postpartum. *Clin Biochem* 1994; 27:63-68.
30. Ahumada AM, Jiménez VC, Cardoso SG, Sienna PJ, Zamora GJ, Posadas RC. Hypoalphalipoproteinemia and atherosclerosis. Genetic and biochemical profile of 10 families. *Arch Inst Cardiol Méx* 1989; 59:9-18.
31. Kwiterovich PO. The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 1998; 82:13Q-21Q.
32. Pérez-Méndez OA, Luc G, Posadas C: Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. *Arch Inst Cardiol Méx* 2000; 70:312-321.

33. Fielding C, Fielding P. Molecular physiology of reverse cholesterol transports. *J Lipid Res* 1995; 36:211-228.
34. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray W, Melchio GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesterol ester transfer protein. *Nature* 1993; 364:73-75.
35. Zong S, Sharp Ds, Grove JS. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996; 97:2917-2923.
36. Oliveira HCF, Ma L, Milne R, Marcovina SM, Inazu A, Mabuchi H, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein activity enhances plasma cholesteryl ester formation. Studies in CETP transgenic mice and human genetic CETP deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1045-1052.
37. Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, Arai T, Maruyama T, Yoshida Y, Ishigami M, Sakai N, Kameda-T K, Matsuzawua Y. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1053-1059.
38. Ritsch A, Drexel H, Amann FW, Pfeifhofer Ch. Patsch JR. Deficiency of cholesteryl ester transfer protein. Description of the molecular defect and the dissociation of cholesteryl ester and triglyceride transport in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3433-3441.
39. Freeman DJ, Packard CJ, Shepherd J, and Gaffney D. Polymorphism in the gene coding for cholesteryl ester transfer protein are related to the plasma high-density lipoprotein cholesterol and transfer protein activity. *Clinical Science* 1990; 79:575-581.
40. Inazu A, Maryanne LB, Hesler BC, Angellon LB, Koimuzi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, Tall AR. Increased high-density lipoprotein levels causes by a common cholesteryl ester transfer protein gene mutation. *N Engl Med* 1990; 323:1234-1238.

41. Kondo I, Berg K, Dryna D, Laawn R. DNA polymorphism at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) is associated with high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein levels. *Clin Genet* 1989; 35:49-56.
42. Kuivenhoven JA, Knijff P, Boer JMA, Smalheer HA, Botma GJ, Seidell JC, Kastelein JJP, Pritchard PH: Heterogeneity at the CETP gene locus. Influence on plasma CETP concentrations and HDL cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:568-568.
43. Dullaart RPF, Hoogenberg K, Riemens SC, Groener JEM, Toll A, Sluiter WJ, Stulp BK. Cholesteryl ester transfer protein gene polymorphism is a determinant of HDL cholesterol and of the lipoprotein response to a lipid-lowering diet in type 1 diabetes. *Diabetes* 1997; 46:2082-2087.
44. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, Otvos JD, Osgood D, Martínez A, Lahoz C, Peter C, Wilson WF, Schaefer EJ. Association of the cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1323-1329.
45. Wu JH, Lee YT, Hsu HCh, Hsieh LL. Influence of CETP gene variation on plasma lipid levels and coronary heart disease: a survey in Taiwan. *Atherosclerosis* 2001; 159:451-458.
46. Lerman, GI. Villa AR, Llaca MC, Turribiatez CL, Aguilar SCA, Villagra L, Wong B, López AJC, Gómez PF, Gutiérrez RLM. The prevalence of obesity and its determinant in urban and rural aging mexican population. *Obes Res* 1999; 402-406.
47. Aguilar SCA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Perez FJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepulveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001; 42:1298-1307.
48. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ, Dextran Sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28:1379-1388.

49. DeLong DM, DeLong DR, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low-and very low-density lipoprotein cholesterol. The Lipid research Clinics prevalence Study. *JAMA* 1986; 256:2372-2377.
50. Miller SA, dykes DD, Polesky IF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988; 16:1215.
51. Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague Y, Ricard S, Poirier O, Jemaa R, Evans A, Dominique A, Marquez VP, Bard JM, Fruchart JC, Ducimetière P, Apfelbaum M, Cambien F. Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest* 1995; 96:1664-1671.
52. Posadas RC, Yamamoto KL, Lerman GI, Zamora GJ, Fajardo GA, Velásquez L, Cardoso SG. The prevalence of NIDDM and associated coronary risk factor in México city. *Diabetes Care* 1994; 17:1441-1448.
53. Hegele RA. Monogenic dyslipidemias: window on determinants of plasma lipoprotein metabolism. *Am J Genet* 2001; 69:000-000.
54. Barter P. CETP and Atherosclerosis. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2000; 20:2029-2031.
55. Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:389-396.
56. Mitchell RJ, EARL L, Williams J, Bisucci T, Gasiamis H. Polymorphisms of the gene coding for the cholesteryl ester transfer protein and plasma lipid levels in Italian and Greek migrants to Australia. *Human Genetics* 1994; 1:13-25.
57. Tenkanen H, Koskinen P, Kontula K, Aalto SK, Mänttari M, Manninen V, Runeberg SL, Taskinen MR, Ehnholm Ch. Polymorphisms of gene encoding cholesterol ester transfer protein and serum lipoprotein levels in subjects with and without coronary heart disease. *Human Genetics* 1991; 87:574-578.

58. Durlach A, Clavel Ch, Girar-Globa A, Durlach V. Sex-dependent association of genetic polymorphism of cholesteryl ester transfer protein with high-density lipoprotein cholesterol and macrovascular pathology in type II diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3656-3659.
59. Bernard, S. Moulin Ph. Lagrost L. Picard S. Elchebly M. Ponsin G. Chapuis F. Berthezene F. Association between plasma HDL cholesterol concentration and Taq1B CETP gene polymorphism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Lipid Res* 1998; 39:59-65.
60. Vohl MC, Lamarche B, Pascot A, Leroux G, Prud'homme D, Bouchard C, Nadeau A, Despres JP. Contribution of the cholesteryl ester transfer protein gene Taq1B polymorphism to the reduced plasma HDL-cholesterol levels found in abdominal obese men with the features of the insulin resistance syndrome. *Int J Obes* 1999; 23:918-925.
61. Mendis S, Shepherd J, Packard Ch J, Gaffney D. Genetic variation in the cholesteryl ester transfer protein and apolipoprotein A-1 genes and its relation to coronary heart disease in Sri Lanka Population. *Atherosclerosis* 1990; 83:21-27.
62. Aguilar SCA, Vázquez CC, Gamboa MR, García SN, Ríos GJ, Holguin R, Vela S, Ruíz AF, and Mayagoitia S. Obesity, diabetes, hypertension and tobacco consumption in an urban adult mexican population. *Arch Med Res* 2001; 32:446-453.
63. Barbier O, Pineda Torra I. Duguay Y, Blanquart C, Fruchuart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2002; 22:717-726.