

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

BÚSQUEDA DE VARIANTES POSIBLEMENTE
FUNCIONALES EN EL GEN *APOA1* ASOCIADAS
A HIPOALFALIPOPROTEINEMIA.

T E S I N A

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

P R E S E N T A

Q.F.B. ANA MARGARITA ZAVALA ORTIZ

DIRECTOR DE TESINA: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

MEXICO, D.F.

2006



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.

Jurado asignado:

Presidente: M. en C. Mario Cárdenas de León

Vocal: Dra. Marta Menjivar Iraheta

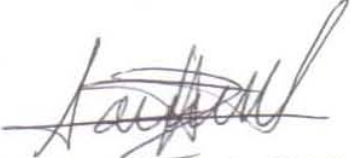
Secretario: M. en C. Guadalupe Ortiz López

Primer Suplente: Dra. Marisol López López

Segundo Suplente: Dr. José Pérez Jáuregui

El trabajo experimental de esta tesina fue realizado en el departamento de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Asesor:


Dr. Samuel Canizales Quinteros

Sustentante:


Q.F.B. Ana Margarita Zavala Ortiz

DEDICATORIAS.

Al **Ser Supremo**, gracias por todas las bendiciones que he recibido.

A **Rubén**, con todo mi amor y gratitud por su comprensión, amor y por todos los momentos felices que hemos compartido, gracias por tu gran apoyo.

Con todo mi amor y cariño a mis hijos **Rubén Alberto, Alejandro y Luis Enrique**, que se esfuerzan cada día por superarse y lograr las metas que se han fijado, gracias por su apoyo, cariño y paciencia.

A mis padres **José Manuel y Margarita**, que Dios los conserve muchos años, con un inmenso amor y agradecimiento.

A mis hermanos **Francisco Javier, Ana María, José Manuel, Rosa María y Luisa Fernanda** y a sus parejas por ser cada quien como es y que continuemos siendo una familia unida como hasta ahora.

A mis cuñados, cuñadas, sobrinos y sobrinas por su diversidad y unión en todo momento.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros, asesor en esta tesina por su desinteresada labor y apoyo constante, fue un pilar muy importante en el aprendizaje para la realización de este proyecto, gracias por los comentarios y revisión del mismo.

A los miembros del jurado y revisores de esta tesina M. en C. Mario Cárdenas León, Dra Marta Menjívar Iraheta, M. en C. Guadalupe Ortiz López, Dra. Marisol López López y al Dr. José Pérez Jáuregui, gracias por sus valiosos consejos sobre el presente trabajo.

A la Dra. María Teresa Tusié Luna jefe del Laboratorio de Medicina Genómica en donde fue realizado el actual trabajo experimental.

A la Dra. Teresa Villarreal por su gran ayuda y consejos en esta área.

A todos los compañeros del Laboratorio de Medicina Genómica que me apoyaron constantemente: Biol. Salvador Ramírez, M. en C. Laura Riba, Q.F.B. Teresa Guerra, Q:F:B: Leonor Jacobo, Q.F.B. Rosario Pérez, Biol. Marisela Villalobos, Q:F:B: Eloína Gutiérrez, T.S. Maribel Rodríguez, Verónica Noveron, Q.F.B. Ma. Luisa Ordoñez, Dr. José Esparza, Q. Rocio Salas y Q. Rosa Ma. Cerezo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo en este proyecto.

ÍNDICE GENERAL.	PAG.
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.-LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	1
1.1 Lípidos.....	1
1.2 Apolipoproteínas	1
1.3 Lipoproteínas.....	2
2.- TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL (TRC)	3
3.- ATEROESCLEROSIS	5
4.- RELACIÓN HDL-ATEROESCLEROSIS	6
5.- HIPOALFALIPOPROTEINEMIA	7
6.- APOLIPOPROTEÍNA A-I.....	8
6.1 Generalidades	8
6.2 Variantes de Apo A-I	10
7.- VARIANTES FUNCIONALES EN PACIENTES CON HIPOALFALIPOPROTEINEMIA.....	11
8.- EPIDEMIOLOGÍA	12
II.- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
III.-HIPÓTESIS.....	15
IV.- OBJETIVOS	16
1.- OBJETIVO GENERAL.....	16
2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
V.- METODOLOGÍA.....	17
1.- SUJETOS	17
2.- CARACTERIZACIÓN CLÍNICA	18

3.- MÉTODOS	19
3.1 Entrevista	19
3.2 Determinaciones bioquímicas	19
3.3 Extracción de ácido desoxirribonucleico	20
3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
3.5 Secuenciación del gen <i>APOA1</i>	22
3.6 Análisis estadístico de datos	22
VI.- RESULTADOS.....	24
1.- Datos antropométricos, clínicos y bioquímicos	24
2.- Análisis del gen <i>APOA1</i> en pacientes con hipoalfalipoproteinemia	26
VII.- DISCUSIÓN.....	29
VIII.- CONCLUSIONES.....	32
IX.- PERSPECTIVAS.....	33
X.- BIBLIOGRAFÍA.....	34
XI.- ANEXOS.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Índice de Figuras.

Figura 1.- Lipoproteína (Ej. Lipoproteína de alta densidad HDL).....	2
Figura 2.- Transporte reverso del colesterol (TRC).....	4
Figura 3.- Correlación HDL-Apo A-I.....	25
Figura 4.- Electroferogramas de los polimorfismos encontrados en el gen de la apolipoproteína A-I.....	27

Índice de Tablas.

Tabla 1.- Tamaño, densidad y composición de las principales lipoproteínas.....	3
Tabla 2.- Valores de referencia de determinaciones bioquímicas.....	20
Tabla 3.- Valores medios de medidas antropométricas, clínicas y bioquímicas...	24
Tabla 4.- Cuadro comparativo entre grupos hipo e hiperalfalipoproteinemia.....	26
Tabla 5.- Frecuencias del polimorfismo -75 G>A.....	28

ABREVIATURAS Y SIGLAS

A	Adenina
ABCA1	Transportador transmembranal ABCA1
ABCG1	Transportador transmembranal ABCG1
ABCG4	Transportador transmembranal ABCG4
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
<i>APOA1</i>	Gen de la apolipoproteína A-I
Apo B	Apolipoproteína B
Apo C	Apolipoproteína C
Apo E	Apolipoproteína E
Apos	Apolipoproteínas
°C	Grado centígrado
C	Citosina
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CL	Colesterol libre
cm	Centímetro
CT	Colesterol total
D.O.	Densidad óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
E	Ácido glutámico
EAC	Enfermedad arterial coronaria
EC	Ésteres de colesterol

EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
G	Guanina
HALP	Hipoalfalipoproteinemia
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HGMD	Base de datos de mutaciones en genes humanos
HL	Lipasa hepática
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
ISV2+41T>C	Cambio de timina por citosina en la posición 41 del intrón 2
ISV3+33C>T	Cambio de citosina por timina en la posición 33 del intrón 3
IMC	Índice de Masa Corporal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
kb	Kilobase
kDa	Kilo daltón
kg/m ²	Kilogramo por metro cuadrado
L144R	Cambio del aminoácido leucina en posición 144 por arginina
L159P	Cambio del aminoácido leucina en posición 159 por prolina
L159R	Cambio del aminoácido leucina en posición 159 por arginina
LCAT	Lecitina:colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
mg/dl	Miligramo por decilitro
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	milimolar

mm Hg	Milímetro de mercurio
NCEP	Programa Nacional de Educación en Colesterol
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
No-HDL	Colesterol no HDL (CT – HDL)
P143R	Cambio de aminoácido prolina en posición 143 por arginina
p	Significancia estadística
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmoles	Picomoles
QM	Quilomicrones
r	Correlación
R51T	Cambio del aminoácido arginina en posición 51 por treonina
R151C	Cambio del aminoácido arginina en posición 151 por cisteína
R173C	Cambio del aminoácido arginina en posición 173 por cisteína
RLDL	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
seg	Segundo
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SPSS	Paquete estadístico para ciencias sociales
SR-B1	Receptor Basurero tipo B clase 1
T	Timina
TG	Triacilgliceroles
TRC	Transporte reverso del colesterol
U	Unidad

VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
vs	Versus
μg/ml	Microgramo por mililitro
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μU/ml	Microunidades por mililitro
-75G>A	Cambio de nucleótido guanina por adenina en posición -75
%	Porcentaje
>	Mayor que
≥	Mayor o igual que
<	Menor que
≤	Menor o igual que
Δ	Delección

RESUMEN.

La hipoalfalipoproteinemia (HALP) es una dislipidemia que se caracteriza por valores de lipoproteínas de alta densidad (HDL) menores a 40 mg/dl, y ha sido asociada como un factor de riesgo para la enfermedad arterial coronaria (EAC). Diversos estudios muestran que la mayoría de las formas no familiares de HALP son de tipo multifactorial y poligénico y entre los genes que se han sugerido que pudieran afectar los niveles de HDL se encuentra el de la apolipoproteína A-I (*APOA1*). Mutaciones en el gen *APOA1* han sido reportadas en pacientes con HALP familiar. En este estudio se evaluó la contribución del gen *APOA1* en un grupo de 11 individuos no relacionados con HALP y triacilgliceroles normales, los cuales fueron seleccionados de una muestra de 314 individuos de la población mexicana. La región promotora, los 4 exones y parte de los intrones adyacentes del gen *APOA1* fueron analizados a través de secuenciación directa, permitiendo la identificación de tres polimorfismos previamente reportados: -75G>A en el promotor, ISV2+41T>C en el intrón 2 e ISV3+33C>T en el intrón 3. El polimorfismo -75G>A del promotor ha sido asociado principalmente a valores elevados de HDL en distintas poblaciones. Sin embargo, en este estudio no se observó diferencia significativa al comparar la frecuencia obtenida de esta variante en un grupo de individuos con hiperalfalipoproteinemia (HDL > 60mg/dl) vs HALP ($p=0.728$) sugiriendo que la variante -75G>A del promotor no afecta de manera importante la regulación de los niveles de las HDL. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el gen *APOA1* no presenta variantes funcionales que afecten los niveles de HDL en individuos mexicanos con HALP.

I.- INTRODUCCIÓN.

1.- LÍPIDOS Y LIPOPROTEINAS PLASMÁTICAS.

1.1- Lípidos.

Los lípidos son sustancias insolubles en agua que constituyen una parte importante de la alimentación. En el organismo forman la principal fuente de energía metabólica y son parte estructural de las membranas celulares. (Yeagle 1985).

Los lípidos plasmáticos más importantes desde el punto de vista clínico son el colesterol total (CT), colesterol de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés), colesterol de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) y los triacilgliceroles (TG) conocidos clínicamente como triglicéridos (Hegele 2001).

El colesterol es un componente estructural importante de membranas celulares y un precursor en la biosíntesis de ácidos biliares, hormonas esteroideas y vitamina D. Los triacilgliceroles forman parte de las grasas neutras y representan la principal forma de almacenamiento de energía del organismo formando el 95% del tejido adiposo (Ganong 2002).

El colesterol y los triacilgliceroles, debido a su insolubilidad en agua, necesitan unirse a proteínas (apolipoproteínas) para ser transportados en la sangre formando moléculas llamadas lipoproteínas (Hegele 2001).

1.2.- Apolipoproteínas.

Las apolipoproteínas (apos) son un grupo de proteínas solubles en agua que se unen fácilmente a estructuras lipídicas debido a su conformación molecular típica conocida como alfa hélice anfipática. Las apos tienen un papel fundamental en el transporte de los lípidos y actualmente hay evidencias de que

intervienen en el metabolismo de los mismos actuando como cofactores de enzimas y de proteínas transferidoras de lípidos (Segrest et al. 1994).

La mayoría de las apos son sintetizadas en el hígado, con masas moleculares que varían desde menos de 7 kDa (Apo C-I) hasta más de 500 kDa (Apo B-100); sus concentraciones plasmáticas también son muy variables desde 10 mg/dl para algunas de ellas como Apo B-48, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III y Apo E hasta más de 150 mg/dl para Apo A-I (Alaupovic 1971; Bachorik et al. 1997; Marcovina y Packard 2006).

1.3 Lipoproteínas.

Las lipoproteínas son macromoléculas esféricas que transportan, a través del plasma, principalmente colesterol y triacilglicérols, además de fosfolípidos, vitaminas y ésteres de colesterol.

Las lipoproteínas presentan un núcleo hidrofóbico no polar formado por triacilglicérols y ésteres de colesterol, y una capa hidrofílica constituida por fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas (Figura 1) (Ganong 2002; Hegele 2001).

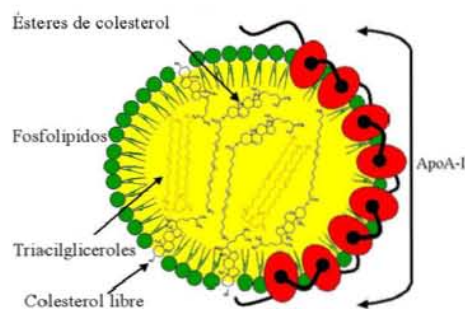


Figura 1.- Lipoproteína (Ej. Lipoproteína de alta densidad, HDL) (Modificado Ganong 2002).

Las lipoproteínas se clasifican en base a su tamaño, densidad y movilidad electroforética (Tabla 1). Las principales lipoproteínas en orden creciente de densidad son: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL,

por sus siglas en inglés), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, por sus siglas en inglés), LDL y HDL. (Todd-Sanford-Davidsohn 1990; Blanche et al. 1981; Neubeck et al.1977; Havel et al.1955).

Tabla 1.- Tamaño, densidad y composición de las principales lipoproteínas.

Lipoproteína	Densidad (g-cm ⁻³)	Diámetro (nm)	Movilidad electroforética	Composición			
				Proteínas %	Principales proteínas	Lípidos %	Principales lípidos
QM	<0.94	75-1000	Origen	1-2	Apo B-48	98-99	Triacilgliceroles
VLDL	0.95-1.006	30 – 80	Pre-β o α ₂	6-10	Apo B-100	90-94	Triacilgliceroles
IDL	1.006-1.019	25 – 40	Pre-β lenta	10	Apo B-100	90	Triacilgliceroles
LDL	1.019-1.063	20 – 25	β	18-22	Apo B-100	78-82	Colesterol
HDL2	1.063-1.125	9 – 12	α ₁	40-50	Apo A-I	45-55	Fosfolípidos
HDL3	1.125-1.210	7.5 – 9	α ₁	50-56	Apo A-II	20-45	Colesterol
					Apo A-I		Fosfolípidos
					Apo A-II		Colesterol

Modificada de Kwiterovich 2002 y Todd-Sanford-Davidsohn 1990

Los QM y las VLDL transportan principalmente triacilgliceroles mientras que las LDL y HDL transportan preferentemente colesterol. El metabolismo de las lipoproteínas es una red compleja de procesos bioquímicos que comprende desde su ensamblaje hasta su catabolismo en donde el mecanismo llamado transporte reverso del colesterol es un punto clave en la regulación de los niveles de las mismas (Ganong 2002; Hegele 2001).

2.- TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL (TRC).

El transporte reverso del colesterol es un mecanismo por el cual el colesterol que se encuentra en las células periféricas regresa al hígado para ser excretado o reutilizado.

El primer paso del TRC se conoce como eflujo del colesterol el cual lleva a cabo la extracción de éste de las células periféricas y se realiza por simple difusión pasiva o ayudado por transportadores transmembranales como son: ABCA1, ABCG1 y ABCG4. Cuando el mediador es el transportador ABCA1 las

partículas receptoras de colesterol libre y fosfolípidos son las apolipoproteínas A-I no lipidadas, mientras que para los transportadores ABCG1 y ABCG4 las moléculasceptoras son las HDL₂ y HDL₃ (Wang et al. 2004; Klerkx et al. 2006).

Las Apo A-I no lipidadas al unirse al colesterol forman las HDL nacientes que son partículas discoidales ricas en apolipoproteínas (HDL₃). Cuando el colesterol que contienen se esterifica por acción de la enzima lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) se transforman en moléculas hidrofóbicas llamadas HDL maduras (HDL₂) de forma esférica, mayor tamaño y menor densidad.

Las HDL maduras depositan directamente los ésteres de colesterol en el hígado ayudadas por el receptor tipo basurero SR-B1 o, indirectamente, transfiriéndolos a las VLDL y LDL de donde pasan al hígado a través de los receptores hepáticos de las lipoproteínas de baja densidad (RLDL) (Figura 2) (Brewer 2004; Ohashi et al. 2005; Boekholdt 2006).

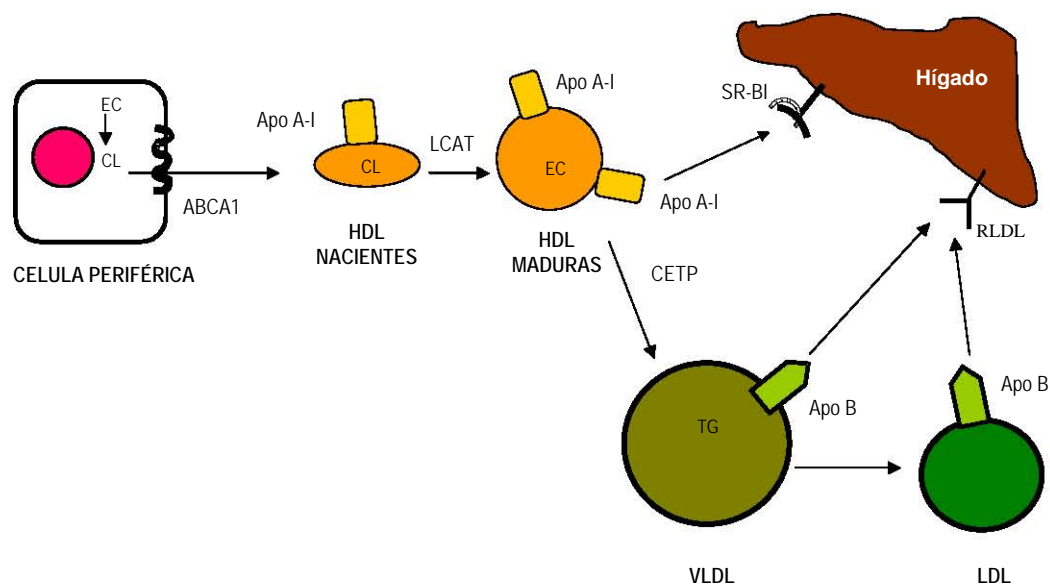


Figura 2.- Transporte inverso del colesterol (Modificado de Rader y Maugeais 2000).

CL: Colesterol libre, EC: Ésteres de colesterol, TG: triacilgliceroles, LCAT: Lecitina:colesterol aciltransferasa, CETP: Proteína transferidora de ésteres de colesterol, SR-B1: Receptor basurero tipo B clase 1 y RLDL: Receptor de LDL.

3.- ATEROESCLEROSIS.

La aterosclerosis es uno de los principales procesos que conducen a la enfermedad arterial coronaria (EAC). En los países desarrollados la EAC constituye la principal causa de muerte desde mediados del siglo XX (Fuster 1999), y actualmente en México se encuentra dentro de las cinco primeras causas de mortalidad (Secretaría de Salud, México 2002; Secretaría de Salud, México 2004).

La aterosclerosis es un desorden de tipo inflamatorio caracterizado por la formación de placas de tejido fibroso llamadas ateromas. Estas placas se inician por la acumulación y subsecuente oxidación de las LDL depositadas en la capa íntima de la arteria. Los monocitos diferenciados en macrófagos son atraídos al lugar de la lesión en donde internalizan los lípidos, principalmente LDL-oxidadas, transformándose en células espumosas (Fan y Watanabe 2003; Barter 2005; Bhakdi 2003).

A la lesión inicial en la pared arterial se van agregando otras partículas como los linfocitos T, plaquetas, células de músculo liso, factores de crecimiento y citocinas, todos ellos involucrados en el desarrollo de una lesión que se calcifica formando finalmente el ateroma (Barter 2005; Fan y Watanabe 2003; Ganong 2002).

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial resultante de la interacción de factores genéticos y ambientales. Se cree que los factores genéticos contribuyen entre un 50 y un 70% a la enfermedad como lo demuestran estudios en gemelos idénticos (Koskenvuo et al. 1992; Scheuner 2001), incluido un pequeño porcentaje formado por las enfermedades de tipo mendeliano como

la hipercolesterolemia familiar y la hipoalfalipoproteinemia familiar (Lusis et al. 2004). Algunos de los factores ambientales que la afectan son: tabaquismo, alcoholismo, dieta alta en grasas y sedentarismo entre otros.

Diversos estudios tanto epidemiológicos, como en modelos animales han mostrado que las concentraciones anormales de lípidos y lipoproteínas en plasma (dislipidemias) favorecen el desarrollo y la evolución de la aterosclerosis. Se ha observado que los valores disminuidos de HDL en plasma (hipoalfalipoproteinemia) aumentan la incidencia de la misma. Otros factores de riesgo asociados conocidos son: edad, sexo, obesidad y diabetes (Castelli et al 1992; Gordon y Rifkind 1989; Lusis et al 2004).

4.- RELACIÓN HDL-ATEROESCLEROSIS.

Estudios epidemiológicos han mostrado una relación inversamente proporcional entre los niveles plasmáticos de HDL y el riesgo de desarrollar enfermedad arterial coronaria, sugiriendo que las HDL tienen un efecto protector contra el desarrollo de la aterosclerosis. (Gordon et al. 1977; Lewis 1983; Miller 1987; Gordon y Rifkind 1989; Rubins et al. 1999; Johansson et al. 1991a; Junyent et al. 2006).

Actualmente se conocen 5 subfracciones de HDL: HDL_{3c}, HDL_{3b}, HDL_{3a}, HDL_{2a} y HDL_{2b} de acuerdo al orden ascendente en el tamaño de su diámetro (Blanche et al. 1981). Algunos estudios sugieren que el efecto protector o anti-aterogénico es mayor cuando la relación de la subfracción HDL_{2b} aumenta con respecto a las subfracciones HDL_{3c} y HDL_{3b} (Johansson et al. 1991b; Williams et al. 1997).

El efecto antioxidante y la capacidad antiinflamatoria de las HDL contribuyen a sus efectos cardioprotectores pero se cree que el papel que juegan las HDL en el transporte reverso del colesterol es de primordial importancia para su efecto anti-aterogénico. (Schultz y Rubin 1994; Cockerill y Reed 1999; Mackness y Durrington 1995; Badimon et al. 1990; Barter 2005).

Otros hallazgos que apoyan la importancia anti-aterogénica de las HDL se basan en estudios clínicos dirigidos no solamente a disminuir los niveles de LDL, estrategia que redujo solo el 45% de los casos de EAC, sino también a aumentar los niveles de las HDL, representando una alternativa viable para aminorar el otro 55% de riesgo cardiovascular (*Heart Protection Study Collaborative Group* 2002; Brewer 2004; Klerkx 2006; Calabresi et al. 2006).

5.- HIPOALFALIPOPROTEINEMIA.

Se le llama hipoalfalipoproteinemia (HALP) a la dislipidemia que se caracteriza por tener niveles de HDL menores a la percentila 10 (ajustados por edad y género), o de acuerdo al Programa Nacional de Educación en Colesterol (NCEP, por sus siglas en inglés) niveles de HDL menores a 40 mg/dl (*National Cholesterol Education Program* 2002). Se ha demostrado que hasta un 40% de las personas con enfermedad arterial coronaria prematura padecen de HALP (Genest et al. 1993).

El 50-70% de la variación en los niveles de las HDL está determinada genéticamente (Whitfield y Martin 1983; Heller et al. 1994; Miller et al. 2003). Los análisis de segregación indican que la HALP tiene una herencia poligénica sin descartar efectos de genes dominantes y recesivos que se han detectado en por

lo menos un 10% de las familias (Breslow 1995; Tall y Breslow 1996; Rader y Maugeais 2000; Canizales-Quinteros et al. 2003).

Aunque se ha encontrado asociación con algunas variantes de los genes que intervienen en el transporte reverso del colesterol como CETP, LCAT, lipasa hepática (HL) con los niveles de HDL, existen estudios que sugieren que el eflujo del colesterol es el proceso principal implicado en la regulación de las HDL (Zannis et al. 2006; Yancey et al. 2003). Es por ello que los genes que intervienen en este proceso como el *ABCA1*, *SR-B1*, *ABCG1*, *ABCG4* y *APOA1* son un importante blanco de estudio en la identificación de variantes génicas asociadas al fenotipo HALP (Tall y Wang 2000; Hayden et al. 2000; Yancey et al. 2003; Lackner et al. 1993; Han et al. 1999; Hovingh 2005).

6.- APOLIPOPROTEÍNA A-I.

6.1 Generalidades.

La apolipoproteína A-I (Apo A-I) es la más abundante en plasma y constituye entre el 70 y 90% de la fracción proteica de las HDL. Los niveles plasmáticos de Apo A-I son generalmente mayores en mujeres y correlacionan con la concentración de las HDL (Schonfeld y Pfeleger 1974; Karlin et al. 1976; Breslow et al. 1982).

Al igual que las HDL, se ha sugerido que concentraciones altas de Apo A-I inhiben la evolución de la aterosclerosis, por lo que se les ha considerado como un factor anti-aterogénico (Li et al 2003).

La Apo A-I es sintetizada principalmente en hígado e intestino como un precursor proteico conocido como pre-pro-Apo A-I constituido por 267

aminoácidos (Law et al. 1983), siendo eliminados los 24 aminoácidos aminoterminales para convertirse en una proteína madura de 243 aminoácidos (Brewer et al. 1978).

La Apo A-I participa activamente en el eflujo del colesterol aceptando el colesterol de las células periféricas para formar las HDL nacientes y activando a la enzima LCAT (Fielding et al. 1972; Fielding y Fielding 1995; Barter y Rye 1996). La importancia de Apo A-I en el transporte reverso del colesterol ha sido mostrada en ratones deficientes de esta apolipoproteína, los cuales presentan una disminución tanto en los niveles de HDL como de colesterol total hasta en un 70%, así como un decremento del 75% en la actividad de LCAT (Williamson et al. 1992; Plump et al. 1997; Parks et al. 1995; Temel et al. 2002).

En la estructura de la Apo A-I se han identificado repeticiones de 11 y 22 aminoácidos unidos por residuos de prolina. Estas estructuras en forma de alfa hélices anfipáticas le proporcionan estabilidad a las partículas HDLs. Para su unión a los lípidos se requieren los dominios amino y carboxilo terminal mientras que el dominio central ha sido relacionado con la activación de LCAT (Martín-Campos et al. 2002; Fitch 1977; Frank y Marcel 2000; Chroni et al. 2005; Ajees et al. 2006; Zhu et al. 2005).

En 1978 fue reportada la secuencia completa de aminoácidos para la proteína Apo A-I (Brewer et al. 1978). El gen *APOA1* se encuentra en el cromosoma 11 banda q23.3. Este gen forma parte de un grupo de genes (*APO A1-C3-A4-A5*), está constituido por cuatro exones y tres regiones intrónicas que suman 1.87 kb. La extensión de los exones es de 18, 63, 157 y 659 pb respectivamente (Cheung et al. 1984; Arinami et al. 1990).

6.2 Variantes de Apo A-I.

A la fecha se encuentran reportadas un total de 43 variantes para el gen *APOA1*, 10 de las cuales producen el fenotipo de HALP y/o deficiencia de HDL ya sea por sustitución de nucleótidos, deleciones o inserciones (*Human Gene Mutation Database*) (HGMD Stenson et al. 2003). Se ha identificado una frecuencia mutacional entre el 5 y 6% en individuos con HALP (Araki et al. 1994; Von Eckardstein et al. 1990; Yamakawa-Kobayashi et al. 1999).

La primer variante reportada para el gen *APOA1* se denominó Apo A-I_{Milano} (R173C), la cual fue identificada en una familia italiana con hipoalfalipoproteinemia pero sin presencia de aterosclerosis (Franceschini et al. 1980; Weisgraber et al. 1983). La hipótesis actual para este fenotipo también presentado por la variante Apo A-I_{Paris} (R151C), es que la cisteína que sustituye a la arginina produce una actividad antioxidante (Bielicki y Oda 2002). Actualmente, una proteína recombinante de Apo A-I conteniendo la mutación_{Milano} está siendo utilizada como una estrategia terapéutica en un programa piloto de pacientes con síndrome coronario agudo (Nicholls et al. 2006; Calabresi et al. 2006). Anteriormente, en modelos animales ya se habían demostrado las propiedades anti-aterogénicas, anti-trombóticas, anti-inflamatorias y anti-oxidantes de esta variante (Marchesi y Sirtori 2006; Kaul y Shah 2005).

Aproximadamente la mitad de las variantes reportadas del gen *APOA1* co-segregan con niveles disminuidos o nulos de Apo A-I y/o de HDL por diferentes causas como, por ejemplo, la variante Apo A-I (P143R)_{Giessen} (Utermann 1984) que presenta deficiencia de HDL debido a un defecto en la activación de LCAT. Otros ejemplos de variantes que producen HALP, a través de un efecto dominante

son: Apo A-I (L159P) ^{Zavalla}, Apo A-I (L159R) ^{Finlandia}, Apo A-I(R160L) ^{Oslo}, Apo A-I (ΔE235) ^{Nichinan}, Apo A-I (Δ165-175) ^{Mallorca} y Apo A-I (L144R) ^{Zaragoza}. (Miller et al. 1998; Miettinen et al. 1997; Leren et al. 1997; Han et al. 1999; Martín-Campos et al. 2002 y Recalde et al. 2002).

Además de las mutaciones mencionadas, existen polimorfismos asociados a la variación de los niveles de HDL, tal es el caso de la variante -75G>A ubicada en la región promotora del gen *APOA1*. Esta variante ha sido asociada principalmente a hiperalfalipoproteinemia en distintas poblaciones (Pagani et al. 1990; De Franca et al. 2005; Jeenah et al. 1990). Sin embargo, esta variante también ha sido asociada a otros fenotipos como la hipertrigliceridemia y un riesgo temprano de enfermedad de Alzheimer no familiar (Sorkin et al. 2005; Vollbach et al. 2005).

7.- VARIANTES FUNCIONALES EN PACIENTES CON HIPOALFALIPOPROTEINEMIA.

En la mayoría de los individuos la variación en los niveles de HDL no se hereda como un rasgo monogénico sino como un rasgo cuantitativo complejo. Estos rasgos se regulan a través de la suma acumulada de polimorfismos comunes con un efecto funcional pequeño. Pero una hipótesis relativamente reciente ha sugerido que los fenotipos complejos, como es la regulación de los niveles de HDL, también pueden deberse a variantes raras, no comunes, pero con un efecto mayor sobre el fenotipo (Pritchard 2001).

Para detectar estas variantes génicas con un efecto funcional importante se ha utilizado una estrategia en la cual se buscan cambios no sinónimos en

individuos que se encuentran en los extremos del rasgo cuantitativo complejo (en este caso hipoalfalipoproteinemia e hiperalfalipoproteinemia). Una variante detectada en individuos con niveles bajos de HDL y no encontrada en individuos con niveles altos de HDL, podría presentar un efecto funcional importante en la modulación de los niveles de las HDL (Cohen et al. 2004; Frikke-Schmidt et al. 2004).

8.- EPIDEMIOLOGÍA.

Las enfermedades cardiovasculares representan un serio problema de salud pública en México ya que de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) y a la Secretaría de Salud desde el año 2000 se encuentran junto con la diabetes entre las dos primeras causas de muerte en población mexicana. Para el año 2002 la enfermedad isquémica del corazón fue la primer causa de muerte en hombres (10.5%) y la segunda causa en mujeres (10.7%) (Secretaría de Salud, México 2002; Secretaría de Salud, México 2004).

El nivel de los lípidos en el plasma es el indicador clínico más comúnmente utilizado para medir el riesgo potencial de enfermedad cardiovascular prematura. Se ha visto que las concentraciones tanto de lípidos como de lipoproteínas varían entre las diferentes poblaciones debido a factores tanto genéticos como ambientales (Segal et al. 1982), No existen valores de referencia universalmente aceptables, pero se asumen como tales los niveles de lípidos con los cuales comienza a existir riesgo de daño a nivel arterial debido al depósito de los mismos, publicados por el NCEP 2002.

Para definir el factor de riesgo cardiaco se han utilizado diferentes relaciones entre los lípidos como, LDL/HDL, CT/HDL, No-HDL/HDL.

Recientemente se ha descrito la relación Apo B/Apo A-I como un buen marcador de riesgo cardiovascular (Packard y Saito 2004; Walldius y Jungner 2004; Walldius et al. 2006).

De acuerdo a un estudio realizado en población mexicana urbana de entre 20 y 69 años, las dislipidemias más comunes en México son la HALP (definida como HDL < 35 mg/dl) con una frecuencia de 46.2% en hombres y 28.7% en mujeres y en segundo lugar la hipertrigliceridemia (TG \leq 200 mg/dl) con una frecuencia de 31.9% en hombres y 18.8% en mujeres. La combinación triacilgliceroles altos/HDL bajos fue el patrón de lípidos anormales con mayor prevalencia teniendo una frecuencia de 18.6% en población general (Aguilar-Salinas et al. 2001).

II.- JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La HALP es la dislipidemia más frecuente en la población mexicana, con una de las prevalencias más altas reportadas en el mundo. Sin embargo, aún con la importancia epidemiológica que presenta esta dislipidemia para nuestra población, no existen reportes en la literatura que evalúen la contribución del componente genético en el desarrollo de este padecimiento.

Uno de los procesos más importantes en la regulación de los niveles de las HDL es el transporte reverso del colesterol, y particularmente, el paso inicial del mismo, conocido como eflujo del colesterol en el cual se forman las HDL nacientes. Este primer paso parece ser el más importante para entender la relación inversa entre los niveles de HDL y el desarrollo de aterosclerosis, además explica más del 40% de los casos de HALP.

Como parte de un proyecto en el que se analizarán los genes que participan en el eflujo del colesterol, en este estudio se determinará la participación de la proteína Apo A-I en la regulación de los niveles de las HDL en individuos con HALP, a través de la búsqueda de variantes con cambio de aminoácido o en la región reguladora del gen *APOA1* y se establecerá su carácter funcional evaluando la presencia de estas variantes en un grupo de individuos con hiperalfalipoproteinemia.

III.- HIPÓTESIS.

Es posible que existan variantes funcionales en el gen *APOA1* en pacientes con hipoalfalipoproteinemia.

IV.- OBJETIVOS.

1.- OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la contribución del gen *APOA1* en pacientes mexicanos con hipoalfalipoproteinemia.

2.- OBJETIVOS PARTICULARES.

a) Identificar variantes provocadas por un cambio de aminoácido o localizadas en la región reguladora del gen *APOA1* en individuos con hipoalfalipoproteinemia.

b) Establecer el carácter funcional de las variantes identificadas en los individuos con hipoalfalipoproteinemia a través de la búsqueda intencionada en individuos con hiperalfalipoproteinemia.

V.- METODOLOGÍA.

1.- SUJETOS.

Se obtuvieron muestras de 10 ml de sangre periférica de individuos radicados en la ciudad de México (n=314), con al menos 3 generaciones nacidas en México. La población de estudio fue captada en las siguientes instituciones: Universidad Autónoma Metropolitana, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Centro Médico Nacional Siglo XXI e Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

De la muestra anterior se seleccionaron 11 individuos (5 hombres y 6 mujeres) para el análisis del gen *APOA1*, los cuales cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión siguientes:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Edad \geq 18 años.
- Niveles de glucosa \leq 100 mg/dl
- Niveles de HDL \leq 35 mg/dl.
- Triacilgliceroles \leq 150 mg/dl
- Índice de masa corporal $<$ 30 kg/ m².

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Diabetes.
- Niveles de creatinina en suero $>$ 2 mg/dl.
- Enfermedad hepática.
- Hipotiroidismo.
- Terapia hormonal.
- Alcoholismo.

- Tabaquismo.
- Infección aguda tres semanas previas a las mediciones.
- Pacientes con medicamentos hipolipemiantes.
- No cumplir con los criterios de inclusión.

Es importante mencionar que debido a la relación inversa entre los niveles de triacilgliceroles y HDL, se excluyeron aquellos individuos que pudieran presentar HALP secundaria a hipertrigliceridemia.

Para cada participante, se obtuvo el consentimiento informado por escrito (Anexo 1). El protocolo de investigación para la evaluación del componente genético de la variación de los niveles de las HDL en población mexicana fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación en Humanos del INCMNSZ.

2.- CARACTERIZACIÓN CLÍNICA.

De acuerdo a los valores establecidos por el NCEP se consideró hipercolesterolemia cuando los niveles de colesterol total en sangre fueron superiores a 200 mg/dl, hipertrigliceridemia niveles de triacilgliceroles mayores a 150 mg/dl e HALP niveles de HDL < 40 mg/dl (*National Cholesterol Education Program 2002*).

Se definió obesidad valores de IMC ≥ 30 kg/m² y sobrepeso cuando el IMC fue ≥ 25 y < 30 kg/m². Se clasificó como diabéticos a los individuos con niveles de glucosa sanguínea en ayunas ≥ 126 mg/dl o un diagnóstico previo de diabetes (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes 2003*). La hipertensión fue diagnosticada por la medición de presión arterial sistólica ≥ 140 mm Hg, presión arterial diastólica ≥ 90 mm Hg o el uso de medicamentos

antihipertensivos (*World Health Organization-International Society of Hypertension* 1999).

3.- MÉTODOS.

3.1 Entrevista.

En base a un cuestionario estandarizado, mediciones antropométricas y valoración física, se recopilaron los siguientes datos: edad, género, presión arterial sistólica y diastólica, medida de cintura, cadera, peso y altura, antecedentes familiares de enfermedades como diabetes, hipertensión, enfermedad arterial coronaria, hábitos en cuanto al alcohol y cigarro. El índice de masa corporal (IMC) fue calculado de acuerdo a la relación entre el peso (medido en kilogramos) dividido entre la altura (medida en metros) elevada al cuadrado.

3.2 Determinaciones Bioquímicas.

A través de métodos enzimáticos (*Beckman Synchron CX5*) se midieron las concentraciones de glucosa, creatinina, ácido úrico, colesterol total, triacilglicéridos y HDL. Las concentraciones de Apo A-I y Apo B fueron determinadas por nefelometría en un equipo automatizado (*Array Protein System Beckman Coulter*) y las determinaciones de insulina fueron llevadas a cabo en el equipo automatizado de división de diagnósticos ABBOTT (*IMX System*) por medio de inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA, por sus siglas en inglés).

El colesterol de baja densidad fue determinado por medio de la fórmula de Friedewald (Friedewald et al. 1972; Turkalp et al. 2005), la cual tiene una buena

correlación ($r=0.9908$) con determinaciones directas por inmunoseparación, cuando los triacilgliceroles son iguales o menores a 300 mg/dl:

$$\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - \text{TG}/5$$

Las determinaciones bioquímicas fueron realizadas en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Los valores de referencia para estas determinaciones se presentan en la tabla 2.

Tabla 2.- Valores de referencia de determinaciones bioquímicas.

	MUJERES	HOMBRES
Glucosa (mg/dl)	70 – 109	70 – 109
Colesterol (mg/dl)	0 – 200	0 – 200
Triacilgliceroles(mg/dl)	35 – 160	35 – 160
HDL (mg/dl)	35 – 85	35 – 85
LDL (mg/dl)	90 – 130	90 – 130
APO A-I (mg/dl)	101 – 199	94 – 178
APO B (mg/dl)	49 – 103	52 – 109
Insulina ($\mu\text{U}/\text{ml}$)	2 – 25	2 – 25

3.3 Extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA).

El DNA de cada una de las muestras en estudio fue extraído a partir de leucocitos obtenidos de sangre periférica anticoagulada a través de un método sin extracciones fenólicas (Buffone y Darlington 1985).

La calidad de las muestras de DNA obtenidas se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y la concentración fue determinada midiendo la absorbancia a 260 nm (1 unidad de absorbancia ó 1 D.O. corresponde a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

La relación 260/280 indica la pureza del DNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O._{260} son las óptimas.

3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos *in vitro* más rápidos para producir grandes cantidades de fragmentos iguales de DNA para su análisis molecular. Se basa en la extensión de 2 oligonucleótidos, cada uno complementario de las cadenas opuestas de DNA adyacentes a la secuencia o fragmento de interés. Se lleva a cabo con la intervención de una polimerasa, la presencia de deoxinucleótidos (dNTPs) y un amortiguador que contiene magnesio.

A través de PCR se amplificaron las regiones codificantes y no codificantes del gen *APOA1* utilizando oligonucleótidos diseñados de acuerdo a la secuencia genómica del gen *APOA1* (Shoulders et al. 1983) (Anexo 2). El exón 4 se dividió en dos partes y se utilizó un par de oligonucleótidos para cada fragmento.

El análisis de la región promotora, los 4 exones del gen *APOA1* y fragmentos intrónicos adyacentes fue realizado a través de PCR como se describe a continuación: para un volumen final de 20 μ l se utilizaron 16 μ l de polimerasa *2x Master Mix* (QIAGEN) (3mM $MgCl_2$, 400 μ M de c/u dNTP, 0.05 U Taq polimerasa), 15 pmoles de cada oligonucleótido y 50 ng de DNA genómico. Para el exón 2 se utilizaron 10.8 μ l de *Master Mix*, 30 pmoles de cada oligonucleótido, 150 ng de DNA y 1% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Gene Amp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 59-62°C por 45 seg, extensión 72°C por 1 min y con una extensión final a 72°C por 10 min. Las temperaturas de alineamiento para cada exón se muestran en el anexo 2.

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% y TBE 0.5x (Tris, ácido bórico, EDTA), se tiñeron con bromuro de etidio y se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb para determinar su tamaño (*DNA Ladder New England Bio Labs Inc*).

3.5 Secuenciación del gen *APOA1*.

Los productos de la amplificación fueron purificados a través de columnas QIAGEN (*QIAquick PCR purification kit*). El producto purificado se utilizó para una segunda PCR en la que se incorporaron nucleótidos fluorescentes de tipo *Big Dye* (*Big Dye terminators v3.0, Applied Biosystems*), las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el fabricante.

Después de la PCR de secuenciación se hizo una nueva purificación utilizando columnas CentriSep (*Applied Biosystems*), se agregó 16 µl de formamida y se desnaturalizó a 96°C durante 4 min. Las reacciones fueron analizadas en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) y la secuencia obtenida de cada uno de los fragmentos se comparó con la previamente reportada (Shoulders 1983).

3.6 Análisis estadístico de datos.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows versión 10.0. Para el análisis de variables continuas se estimaron los valores medios y la desviación estándar. Los valores fueron expresados como la media \pm desviación estándar, los datos fueron redondeados a un decimal. Las frecuencias fueron expresadas en %. Las diferencias significativas entre los subgrupos de las distintas determinaciones fue determinada por la prueba t de student y las diferencias en

las frecuencias entre los grupos de hipo e hiperalfalipoproteinemia fueron determinadas por una prueba exacta de Fisher. En todos los análisis realizados se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

VI.- RESULTADOS.

1.- Datos antropométricos, clínicos y bioquímicos.

La muestra estuvo integrada por n=314 de los cuales un 68.5% fueron mujeres y 31.5% hombres, con una edad promedio de 43.4 años (18-92 años). El 35% de los individuos de la muestra tuvieron sobrepeso y 24.2% obesidad. Se observó diabetes en 7% de la muestra e hipertensión arterial en 29.2% de los individuos. Las siguientes dislipidemias fueron observadas: hipercolesterolemia (61.8%), hipertrigliceridemia (48.7%) e hipoalfalipoproteinemia (HDL < 40 mg/dl) 28%.

Al comparar los niveles de lípidos por género, los valores promedio de colesterol, triacilgliceroles, Apo B y LDL fueron mayores en hombres, alcanzando significancia solamente los 2 últimos parámetros, mientras que en las mujeres se observaron valores promedio superiores de insulina, HDL y Apo A-I, alcanzando estos dos últimos diferencias significativas (Tabla 3).

Tabla 3.- Valores medios de medidas antropométricas, clínicas y bioquímicas.

	MUJERES n=215	HOMBRES n=99	TOTAL n=314
Edad (años) *	44.9 ± 17.1	40.3 ± 15.3	43.4 ± 16.7
IMC (kg/m ²)	27.2 ± 5.5	26.2 ± 4.3	26.9 ± 5.2
Cintura (cm) *	88.4 ± 13.8	92.0 ± 10.6	89.6 ± 12.9
P. A. Diastólica (mmHg)	78.7 ± 11.3	79.6 ± 11.1	79.0 ± 11.3
P. A. Sistólica (mmHg)	122.3 ± 21.1	120.6 ± 20.8	121.8 ± 20.9
Glucosa (mg/dl)	97.3 ± 35.4	97.2 ± 26.1	97.3 ± 32.7
Colesterol (mg/dl)	213.7 ± 43.5	219.3 ± 49.8	215.5 ± 45.6
Triacilgliceroles(mg/dl)	176.6 ±153.2	194.6 ±141.0	182.3 ±149.5
HDL (mg/dl) ***	51.3 ± 14.9	43.8 ± 10.5	48.9 ± 14.1
LDL (mg/dl) *	128.3 ± 37.4	138.0 ± 37.8	131.4 ± 37.7
APO A-I (mg/dl) ***	140.4 ± 22.4	127.2 ± 17.9	136.2 ± 21.9
APO B (mg/dl) **	110.4 ± 29.2	121.0 ± 30.3	113.8 ± 29.9
Insulina (μU/ml)	10.4 ± 8.4	9.0 ± 6.3	10.0 ± 7.8

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 entre géneros

Se realizó un análisis de correlación de los niveles de Apo A-I con los demás parámetros medidos, presentando significancia con la edad ($r=0.264$ $p<0.01$), el colesterol total ($r=0.299$ $p<0.01$) y las HDL ($r=0.826$ $p<0.01$), esta última se presenta en la Figura 3. Correlación inversa de Apo A-I fue observada con los valores de triacigliceroles ($r= -0.199$ $p<0.01$) y con IMC ($r = -0.228$ $p<0.01$), todas las anteriores correlaciones se mantuvieron al ser ajustadas por género.

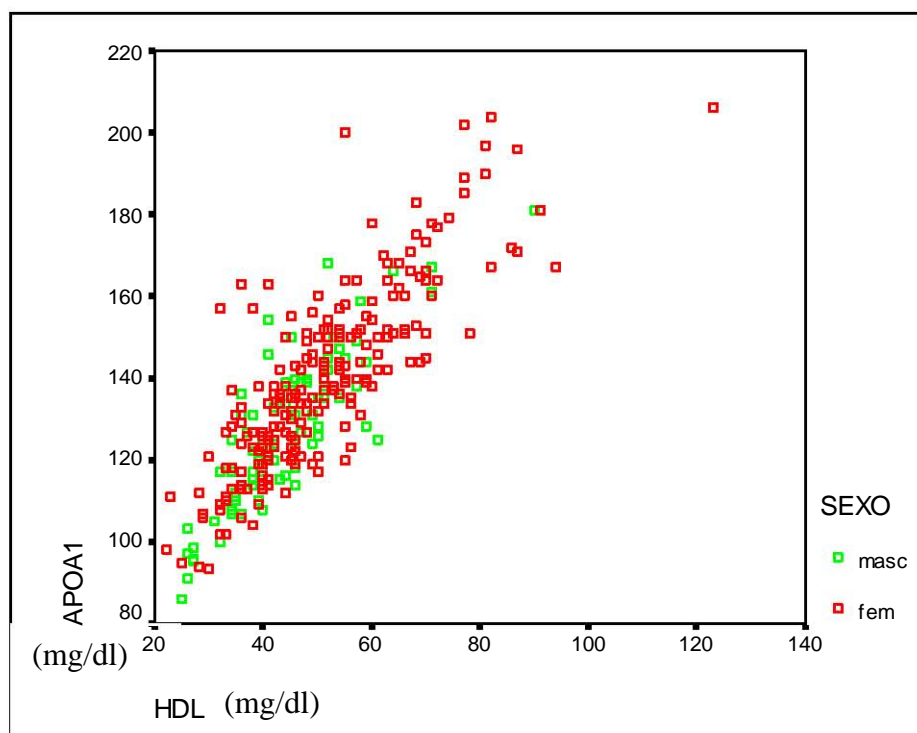


Figura 3.- Correlación HDL Apo A-I

Con base en los criterios del NCEP se identificaron 88 individuos (frecuencia igual a 28.0%) con HALP de los cuales 11 (frecuencia igual a 3.5%) cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión del presente estudio. Para identificar variantes funcionales de Apo A-I, se seleccionó un grupo de 11 individuos con niveles elevados de HDL o hiperalfalipoproteinemia (HDL > 60 mg/dl) que cumplieran con los criterios de inclusión (excepto niveles de HDL

bajos). La comparación de las características antropométricas y de laboratorio de los dos grupos en estudio (hipo e hiperalfalipoproteinemia) se muestran en la Tabla 4, observándose diferencias significativas en los valores de colesterol, HDL, Apo A-I e insulina.

Tabla 4.- Cuadro comparativo entre los grupos con hipo e hiperalfalipoproteinemia

	Hipoalfa lipoproteinemia n=11	Hiperalfa lipoproteinemia n=11
Género (F/M)	6/5	6/5
Edad (años)	36.7 ±13.6	35.5 ±18.8
IMC (kg/m ²)	24.9 ± 2.8	22.2 ± 3.3
Cintura (cm)	85.6 ± 8.8	79.5 ± 8.9
P. A. Diastólica (mmHg)	69.9 ± 10.0	76.6 ± 6.3
P. A. Sistólica (mmHg)	105.9 ± 12.0	115.9 ± 13.5
Glucosa (mg/dl)	90.8 ± 13.9	87.8 ± 10.3
Colesterol (mg/dl) *	150.3 ± 41.4	197.4 ± 37.7
Triacilgliceroles (mg/dl)	107.1 ± 30.2	87.0 ± 42.1
HDL (mg/dl) **	27.9 ± 1.9	77.5 ± 14.6
LDL (mg/dl)	100.9 ± 38.1	102.5 ± 22.6
APO A-I (mg/dl) **	95.9 ± 9.5	164.5 ± 24.6
APO B (mg/dl)	93.1 ± 27.5	83.2 ± 14.9
Insulina (μU/ml) *	11.3 ± 6.0	6.7 ± 2.1

*p<0.05, **p<0.001

2.- Análisis del gen *APOA1* en pacientes con hipoalfalipoproteinemia.

A través del análisis de las secuencias de los 4 exones, los fragmentos intrónicos adyacentes y la región promotora proximal del gen *APOA1* se identificaron 3 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), tanto en forma heterocigota como homocigota (Figura 4). Uno en la región promotora (-75G>A) con una frecuencia del alelo A del 27%, otro en el intrón 2 (IVS2+41T>C), frecuencia del alelo C del 45% y un tercero en el intrón 3 (IVS3+33C>T), frecuencia del alelo T del 23%.

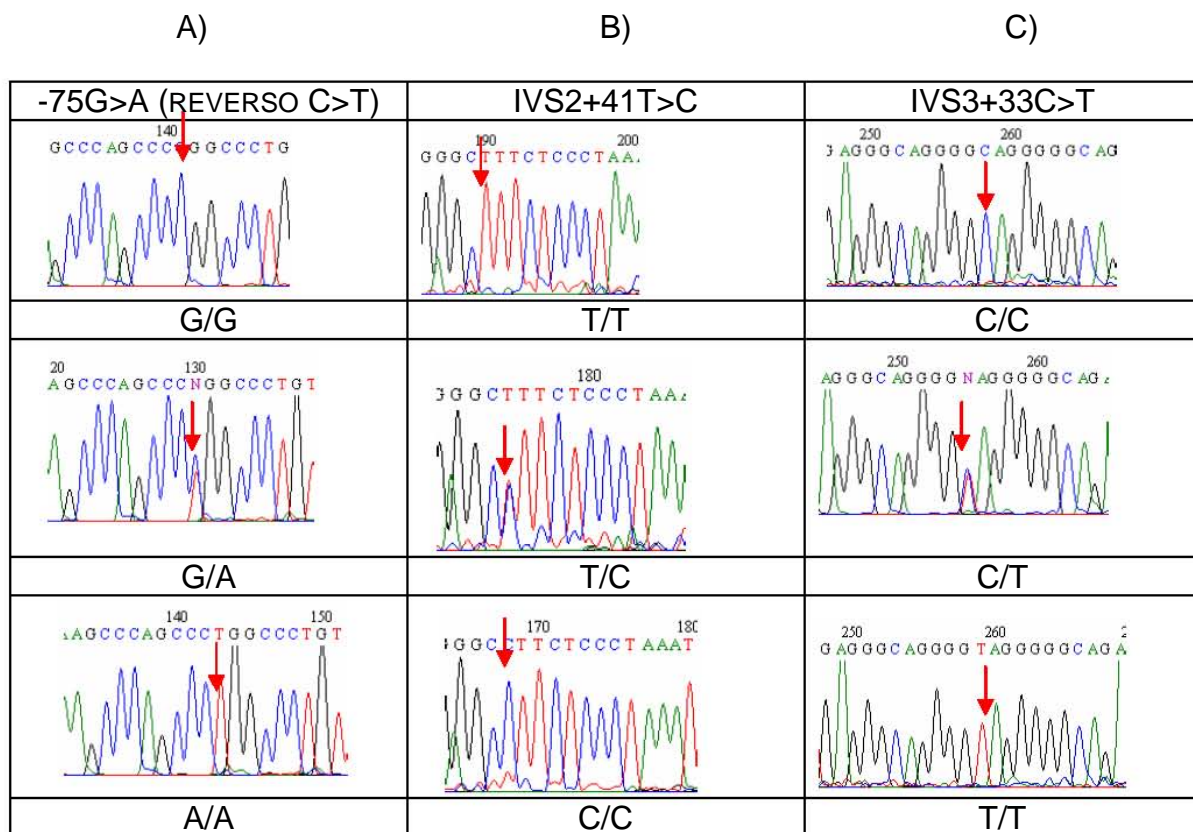


Figura 4.- Electroferogramas de los polimorfismos encontrados en el gen de la apolipoproteína A-I. A) -75G>A (Se presenta la secuencia reversa C>T), en la parte superior no afectado genotipo GG, en la parte media el heterocigoto GA y en la parte inferior el homocigoto AA. B) IVS2+41T>C, en la parte superior genotipo sin cambio TT, en la parte media el heterocigoto TC y en la parte inferior el homocigoto CC. C) IVS3+33C>T, en la parte superior individuo no afectado con genotipo CC, en la parte media el heterocigoto CT y en la parte inferior el homocigoto TT.

Los SNPs IVS2+41T>C e IVS3+33C>T se encuentran reportados en distintas poblaciones con frecuencias alélicas de 21-69% para el alelo C , y 8-45% para el alelo T respectivamente (*JSNP database; Entrez SNP database; JMDBase*), mientras que el polimorfismo -75G>A se encuentra reportado con frecuencias alélicas variables entre 11-28% (Pagani et al. 1990; Barre et al. 1994; Civeira et al. 1993; De Franca et al. 2005; Heng et al. 2001; Jeenah et al. 1990; Kamboh et al. 1996; Chhabra et al. 2005).

Con base en la definición de las variantes con posible efecto funcional (cambio de aminoácido o ubicación en región reguladora), solamente el SNP

-75G>A ubicado en la región promotora fue evaluado. La frecuencia del alelo A en el grupo de hiperalfalipoproteinemia fue del 23%, muy similar a la identificada en los individuos con HALP (27%), no alcanzando diferencia significativa ($p=0.728$), mientras que la frecuencia genotípica fue de 45% en ambos grupos (Tabla 5).

Tabla 5.- Frecuencias del polimorfismo -75 G>A.

	HIPOALFALIPOPROTEINEMIA (n=11)	HIPERALFALIPOPROTEINEMIA (n=11)
GENOTIPO		
GG	6 (55)	6 (55)
GA	4 (36)	5 (45)
AA	1 (9)	0 (0)
ALELOS		
G	16 (73)	17 (77)
A	6 (27)	5 (23)

VII.- DISCUSIÓN.

En México, las enfermedades cardiovasculares (ateroesclerosis como principal causa) ocupan el segundo lugar como causa de muerte desde el año 2000 (Secretaría de Salud, México 2002). Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de esta patología es la hipoalfalipoproteinemia (Castelli et al. 1992; Gordon y Rifkind 1989). Esta dislipidemia es la más frecuente en la población mexicana (Aguilar-Salinas et al. 2001).

Varios estudios han asociado a distintos polimorfismos del gen *APOA1* con algunas dislipidemias (principalmente hipoalfalipoproteinemia) e indirectamente con un mayor riesgo de aterosclerosis (Utermann 1984; Miller et al. 1998; Miettinen et al. 1997; Leren et al. 1997; Han et al. 1999; Martín-Campos et al. 2002; Recalde et al. 2002; y Sorkin et al. 2005;). El mecanismo sugerido para explicar estas asociaciones es a través de la participación de la apolipoproteína A-I en el TRC y particularmente en el eflujo del colesterol de las células periféricas el cual regula la formación de las HDL nacientes (Liu et al. 2003; Ohashi et al. 2005; Yancey et al. 2003; Zannis et al. 2006). Además, es importante mencionar que la apolipoproteína A-I es el componente proteico de mayor proporción de las HDL (Kwiterovich 2002).

Dada la importancia de la apolipoproteína A-I en la modulación de los niveles de HDL, en este estudio se evaluó la participación de variantes génicas con posible efecto funcional en individuos no relacionados con hipoalfalipoproteinemia.

El análisis de los parámetros bioquímicos de la muestra poblacional mostró una fuerte correlación entre los valores de HDL y Apo A-I ($r=0.826$ $p<0.01$)

después de ajustar por edad y género. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en diferentes estudios, los que presentan una relación directamente proporcional entre los niveles de HDL y Apo A-I (Liu et al 2003; Schonfeld y Pflieger 1974; Karlin et al. 1976).

Los niveles de lípidos obtenidos en esta investigación se compararon con un estudio previo realizado en población mexicana por Aguilar-Salinas y colaboradores (2001). Se observaron diferencias entre los valores promedio de colesterol total, HDL y triacilgliceroles (215.5 vs 182.7 mg/dl, 48.9 vs 38.3 mg/dl y 182.3 vs 213.4 mg/dl, respectivamente), que pudieran explicarse por el tamaño de la muestra (2,256 vs 314) y la selección de la misma, ya que en el presente estudio solamente se incluyeron individuos de la ciudad de México y el área metropolitana. Sin embargo, es conveniente mencionar que estas tres dislipidemias tienen una prevalencia importante en ambos estudios en población mexicana.

El análisis de la secuencia de los 4 exones del gen *APOA1* en los 11 individuos con HALP, no mostró ninguna variante que provocara cambio de aminoácido. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cohen y colaboradores (2004), quienes analizaron 128 individuos caucásicos y de raza negra con HALP, identificando solamente una variante con posible efecto funcional (R51T) en el gen *APOA1*, la cual no fue encontrada en un mismo número de individuos con hiperalfalipoproteinemia. Estos estudios, incluyendo el nuestro sugieren que variantes sin sentido (cambio de aminoácido) no parecen ser una causa importante en la modulación de los niveles de HDL en distintas poblaciones. Sin embargo, debido al número reducido de individuos analizados,

no podemos descartar la presencia de estas variantes (cambio de aminoácido en el gen *APOA1*) en individuos mexicanos con HALP.

A través del análisis de secuencia de la región promotora del gen *APOA1*, se identificó el polimorfismo -75G>A, el cual se ha asociado a niveles elevados de HDL en distintas poblaciones, (Jeenah et al 1990; Pagani et al 1990; Ma et al. 2003). De manera interesante, en este estudio se observó una frecuencia similar del alelo A en individuos con hipo e hiperalfalipoproteinemia (27 vs 23%, $p=0.728$), lo cual aunado a reportes que muestran no asociación de este polimorfismo con los niveles de HDL en distintas poblaciones (Civeira et al 1993; Kamboh et al. 1999; Shioji 2004; DeFranca et al. 2005), se sugiere que la variante -75G>A no presenta un efecto importante en la regulación de los niveles de las HDL, aunque no podemos descartar una contribución pequeña de este polimorfismo en la modulación de los niveles de HDL en la población mexicana.

VIII.- CONCLUSIONES.

- 1) Los resultados obtenidos sugieren que el gen *APOA1* no presenta variantes funcionales que afecten los niveles de HDL en individuos mexicanos con HALP.
- 2) El polimorfismo -75G>A en la región promotora del gen *APOA1*, con frecuencias similares en individuos con hipo e hiperalfalipoproteinemia, no parece tener un efecto relevante en la regulación de los niveles de HDL en población mexicana.

IX.- PERSPECTIVAS.

Con base en los datos recopilados se sugiere analizar el polimorfismo -75G>A en la población abierta para determinar su contribución en la regulación de los niveles de HDL y otros lípidos.

BIBLIOGRAFÍA.

Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Ríos JMI, Gómez FJ., Rull J A., Rojas R, Franco A, Sepúlveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001; 42: 1298-1307.

Ajees AA, Anantharamaiah GM, Mishra VK, Hussain MM, Murthy HM. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2126-31.

Alaupovic, P. Apolipoproteins and lipoproteins. *Atherosclerosis*, 1971;13:141.

Araki K, Sasaki J, Matsunaga A, Takada Y, Moriyama K, Hidaka K, Arakawa K. Characterization of two new human apolipoprotein A-I variants: apolipoprotein A-I Tsushima (Trp-108 – Arg) and A-I Hita (Ala-95 – Asp). *Biochim Biophys Acta* 1994;1214:272-278.

Arinami, T.; Hirano, T.; Kobayashi, K.; Yamanouchi, Y.; Hamaguchi, H. : Assignment of the apolipoprotein A-I gene to 11q23 based on RFLP in a case with a partial deletion of chromosome 11, del(11)(q23.3-qter). *Hum. Genet.*1990;85: 39-40.

Bachorik PS, Lovejoy KL, Carroll MD, Johnson CI. Apolipoprotein B and AI distributions in the United States, 1988-1991: results of the National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III). *Clin Chem*. 1997;43(12):2364-78.

Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest*. 1990; 85:1234–1241.

Barre DE, Guerra R, Verstraete R, Wang Z, Grundy SM, Cohen JC. Genetic analysis of a polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter: effect on plasma HDL-cholesterol levels. *J Lipid Res* 1994;35:1292–6.

Barter P. The inflammation: lipoprotein cycle. *Atheroscler Suppl*. 2005;6(2):15-20. Review.

Barter PJ, Rye KA. Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*. 1996;7(2):82-7. Review.

Bhakdi S. An hypothesis for the immunopathogenesis of atherosclerosis. *Clin Nephrol*. 2003;60 Suppl 1:S49-52. Review.

Bielicki JK, Oda MN. Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry*. 2002;41(6):2089-96.

Blanche PJ, Gong EI, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Bioch. Biophys Acta*.1981; 665(3): 408-419.

Boekholdt SM. Common variants of multiple genes that control reverse cholesterol transport together explain only a minor part of the variation of HDL cholesterol levels. *Clin Genet*. 2006;69(3):263-70.

Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin. Chem*. 1985;31:164-165.

Breslow JL. Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism. In Scriver CR, Beaudet AI, Sly WS, Valle D., editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995:2031-2052.

- Breslow JL, Ross D, McPherson J, Williams H, Kurnit D, Nussbaum AL, Karathanasis SK, Zannis VI. Isolation and characterization of cDNA clones for human apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(22):6861–6865.
- Brewer HB Jr. High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(3):387-91.
- Brewer HB Jr., Fairwell T., LaRue A., Ronan R., Houser A. y Bronzert TJ: The amino acid sequence of human apoA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins *Biochem, Biophys. Res. Commun*. 1978; 80:623-630.
- Calabresi L, Sirtori CR, Paoletti R, Franceschini G. Recombinant Apolipoprotein A-I Milano for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Current Atherosclerosis Reports* 2006;8(2):163-167.
- Canizales-Quinteros S, Aguilar-Salinas CA, Reyes-Rodríguez E, Riba L, Rodríguez-Torres M, Ramírez-Jiménez S, Huertas-Vázquez A, Fragoso-Ontiveros V, Zentella-Dehesa A, Ventura-Gallegos JL, Vega-Hernández G, López-Estrada A, Auron-Gómez M, Gómez-Pérez F, Rull J, Cox NJ, Bell GI, Tusié-Luna MT. Locus on chromosome 6p linked to elevated HDL cholesterol serum levels and to protection against premature atherosclerosis in a kindred with familial hypercholesterolemia. *Circ.Res*. 2003; 92(5):569-76.
- Castelli WP, Anderson K, Wilson PW, Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease: The Framingham Study. *Ann Epidemiol*. 1992; 2: 23–28.
- Cheung P, Kao FT, Law ML, Jones C, Puck TT, Chan L. Localization of the structural gene for human apolipoprotein A-I on the long arm of human chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(2):508-11.
- Chhabra S, Narang R, Lakshmy R, Das N. APOA1-75 G to A substitution associated with severe forms of CAD, lower levels of HDL and apoA-I among Northern Indians. *Dis Markers*. 2005;21(4):169-74.
- Chroni A, Kan HY, Shkodrani A, Liu T, Zannis VI. Deletions of helices 2 and 3 of human apo A-I are associated with severe dyslipidemia following adenovirus-mediated gene transfer in apo A-I-deficient mice. *Biochemistry*. 2005;44(10):4108-1117.
- Civeira F, Pocovi M, Cenarro A, Garces C, Ordovas JM. Adenine for guanine substitution -78 base pairs to the apolipoprotein (APO) A-I gene: relation with high-density lipoprotein cholesterol and apoA-I concentrations. *Clin Genet* 1993;44:307–12.
- Cockerill, G. W., and Reed, S. High-density lipoprotein: multipotent effects on cells of the vasculature. *Int. Rev. Cytol*. 1999;188, 257–297.
- Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science*. 2004;305(5685):869-72.
- De Franca E, Alves JG, Hutz MH. APOA1/C3/A4 gene cluster variability and lipid levels in Brazilian children. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(4):535-41.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26 (Suppl. 1):S5–S20.
- Fan J; Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10(2):63-71. Review
- Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res*. 1995;36:211-228.

Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. 1972. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972;46:1493-1498.

Fitch WM. Phylogenies constrained by the crossover process as illustrated by human hemoglobins and a thirteen-cycle, eleven-amino-acid repeat in human apolipoprotein A-I. *Genetics.* 1977;86:623-644.

Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, Weisgraber KH, Mahley RW. A-I_{Milano} apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J. Clin. Invest.* 1980;66:892-900.

Frank PG, Marcel YL. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res* 2000;41:853-872.

Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DJ. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-52.

Fuster, V. Epidemic of cardiovascular disease and stroke: the three main challenges. Presented at the 71st scientific sessions of the American Heart Association. Dallas, Texas. *Circulation* 1999: 99:1132–1137.

Ganong W. Fisiología médica. 18a. edición . El Manual Moderno. Metabolismo de las grasas. Págs. 327-339. México. 2002.

Genest JJ Jr, Bard JM, Fruchard JC, Ordovas JM, Schaefer E J. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb.* 1993;13:1728-1737.

Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am. J. Med.* 1977;62:707-714.

Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein — the clinical implications of recent studies. *N. Engl. J. Med.* 1989;321:1311-1316.

Han H, Sasaki J, Matsunaga A, Hakamata H, Huang W, Ageta M, Taguchi T, Koga T, Kugi M, Horiuchi S, Arakawa K. A novel mutant, apoA-I Nichinan (Glu235 →0), is associated with low HDL cholesterol levels and decreased cholesterol efflux from cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 1999;19:1447-1455.

Havel RJ; Eder H; Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* 1955;34:1345-1354.

Hayden MR, Clee SM, Brooks-Wilson A, Genest J Jr., Attie A, Kastelein JJP. Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:117-122.

Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002;360:7–

Hegele RA. Monogenic Dyslipidemias: Window on Determinants of plasma lipoprotein metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;69:1161-1177.

Heller DA, Pedersen NL, de Faire U, McClearn GE. Genetic and environmental correlations among serum lipids and apolipoproteins in elderly twins reared together and apart. *Am J Hum Genet.* 1994; 55(6):1255-67.

Heng CK, Low PS, Saha N. Variations in the Promoter Region of the Apolipoprotein A-1 Gene Influence Plasma Lipoprotein (a) Levels in Asian Indian Neonates from Singapore. *Pediatr Res*. 2001;49(4):514-8.

Hovingh GK, de Groot E, van der Steeg W, Boekholdt SM, Hutten BA, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2005;16(2):139-45.

Jeenah M, Kessling A, Miller N, Humphries SE. G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations. *Mol Biol Med* 1990;7:233-41.

Johansson J; Carlson LA; Landou C; Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb*. 1991a;11(1):174-82.

Johansson J; Nilsson-Ehle P; Carlson LA; Hamsten A. The association of lipoprotein and hepatic lipase activities with high density lipoprotein subclass levels in men with myocardial infarction at a young age. *Atherosclerosis*. 1991b;86(2-3):111-22.

Junyent M, Cofan M, Nuñez I, Gilibert R, Zambon D, Ros E. Influence of HDL Cholesterol on Preclinical Carotid Atherosclerosis in Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(5):1107-13

Kamboh MI, Aston CE, Nestlerode CM, McAllister AE, Hamman RF. Haplotype analysis of two APOA1/MspI polymorphisms in relation to plasma levels of apo A-I and HDL-cholesterol. *Atherosclerosis* 1996;127:255-62.

Kamboh MI, Bunker CH, Aston CE, Nestlerode CS, McAllister AE, Ukoli FA. Genetic association of five apolipoprotein polymorphisms with serum lipoprotein-lipid levels in African blacks. *Genet Epidemiol*. 1999;16(2):205-22.

Karlin JB; Juhn DJ; Starr JI; Scanu AM; Rubenstein AH. Measurement of human high density lipoprotein apolipoprotein A-1 in serum by radioimmunoassay. *J Lipid Res*. 1976;17(1):30-7.

Kaul S; Shah PK. ApoA-I Milano/phospholipid complexes emerging pharmacological strategies and medications for the prevention of atherosclerotic plaque progression. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5(6):471-9. Review.

Klerkx AH; El Harchaoui K; van der Steeg WA; Boekholdt SM; Stroes ES; Kastelein JJ; Kuivenhoven JA. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(4):706-15.

Koskenvuo M; Kaprio J; Romanov K. Twin studies in metabolic diseases. *Ann Med*. 1992; 24(5):379-81.

Kwiterovich PO Jr. Lipoprotein heterogeneity: diagnostic and therapeutic implications. *Am J Cardiol*. 2002; 90(8A):1i-10i. Review.

Lackner KJ, Dieplinger H, Nowicka G, Schmitz G. High density lipoprotein deficiency with xanthomas. A defect in reverse cholesterol transport caused by a point mutation in apolipoprotein A-I gene. *J Clin Investigation*. 1993;5:2262-73.

Law SW, Gray G, Brewer HBJr. cDNA cloning of human apoA-I: amino acid sequence of preproapoA-I. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1983;112: 257-264.

Leren TP, Bakken KS, Daum U, Ose L, Berg K, Assmann G, von Eckardstein A. Heterozygosity for apolipoprotein A-I(R160L)Oslo is associated with low levels of high density lipoprotein cholesterol and HDL-subclass LpA-I/A-II but normal levels of HDL-subclass LpA-I. *J Lipid Res.* 1997; 38(1):121-31.

Lewis B. Relation of high density lipoproteins to coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1983; 52(4): 5B-8B.

Li M, Liu ZM. [Advances in apolipoprotein A- I and it's anti-atherosclerosis properties] Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2003;19(4):387-91.

Liu L, Bortnick AE, Nickel M, Dhanasekaran P, Subbaiah PV, Lund-Katz S, Rothblat GH, and Phillips MC. Effects of Apolipoprotein A-I on ATP-binding Cassette Transporter A1-mediated Efflux of Macrophage Phospholipid and Cholesterol: Formation of Nascent High density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 2003;278:42976-42984.

Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004; 5:189-218. Review.

Ma YQ, Thomas GN, Ng Mc, Crichley JA, Cockram CS, Chan JC, Tomlinson B. Association of two apolipoprotein A-I gene MspI polymorphisms with high density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels and indices of obesity in selected healthy Chinese subjects and in patients with early-onset type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;59(4):442-9.

Mackness ML, and Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995;115, 243–253.

Marchesi M; Sirtori CR. Therapeutic use of the high-density lipoprotein protein and peptides. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2006;15(3):227-41.

Marcovina S, Packard CJ. Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels *J Intern Med.* 2006;259(5):437-46.

Martín-Campos J, Julve J, Escola J C, Ordoñez J, Gómez J, Binimelis J, Gonzalez F, Blanco F. Apo A-I mallorca impairs LCAT activation and induces dominant familial hypoalphalipoproteinemia. *Journal of Lipid Research.* 2002;43:115-123.

Miettinen HE, Gylling H, Miettinen TA, Viikari J, Paulin L, Kontula K. Apolipoprotein A-I_{Fin}: dominantly inherited hypoalphalipoproteinemia due to a single base substitution in the apolipoprotein A-I gene. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:83-90.

Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am. Heart J.* 1987;113, 589-597.

Miller M, Aiello D, Pritchard H, Friel G, Zeller K. Apolipoprotein A-I Zavalla (Leu 159—Pro) HDL Cholesterol Deficiency in a Kindred Associated With Premature Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 1998,18:1242-1247.

Miller M. Rhyne J, Hamlette S, Bimbaum J, Rodríguez A. Genetics of HDL regulations in human. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(3):273-9. Review.

National Cholesterol Education Program. Third Report of the Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation* 2002;24:3144-3373.

Neubeck W, Wieland H, Habenicht A, Müller P, Baggio G, Seidel D. Improved assessment of plasma lipoprotein patterns. III. Direct measurement of lipoproteins after gel-electrophoresis. *Clin. Chem.* 1977;23:1296-1300.

Nicholls SJ; Tuzcu EM; Sipahi I; Schoenhagen P; Crowe T; Kapadia S; Nissen SE. Relationship between atheroma regression and change in lumen size after infusion of apolipoprotein A-I Milano. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(5):992-7.

Ohashi R. Mu H; Wang X; Yao Q; Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*. 2005;98(12):845-56. Review.

Packard CJ, Saito Y. Non-HDL cholesterol as a measure of atherosclerotic risk. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11(1):6-14. Review.

Pagani F, Sidoli A, Giudici GA, Barengi L, Vergani C, Baralle FE. Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: association with hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1990;31:1371-7.

Parks, J. S., Li, H., Gebre, A. K., Smith, T. L., and Maeda, N. Effect of apolipoprotein A-I deficiency on lecithin:cholesterol acyltransferase activation in mouse plasma. *J. Lipid Res*. 1995;36, 349-355.

Plump, A. S., Azrolan, N., Odaka, H., Wu, L., Jiang X, Tall A, Eisenberg S, and Breslow, JL. ApoA-I knockout mice: characterization of HDL metabolism in homozygotes and identification of a post-RNA mechanism of apoA-I up-regulation in heterozygotes. *J. Lipid Res*. 1997; 38(5), 1033-1047.

Pritchard JK. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am J Hum Genet* .2001;69(1):124-37.

Rader DJ, Maugeais C. Genes influencing HDL metabolism: new perspectives and implications for atherosclerosis prevention. *Molecular Medicine Today. Reviews*. 2000;6:170-174.

Recalde D, Cenarro A, Garcia-Otin AL., Gomez-Coronado D, Civeira F, Pocovi M. Analysis of apolipoprotein A-I, lecithin:cholesterol acyltransferase and glucocerebrosidase genes in hypoalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 2002;163(1):49-58.

Rubins HB, Robins SJ, Collins D Fye CL, Anderson JW, Elan MB, Faas FH, Linares E, Schaeffer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes, J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N. Engl. J. Med*.1999; 341:410-418.

Scheuner MT. Genetic predisposition to coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol*. 2001;16(4):251-60 Review.

Schonfeld G; Pflieger B. The structure of human high density lipoprotein and the levels of apolipoprotein A-I in plasma as determined by radioimmunoassay. *J Clin Invest*. 1974;54(2):236-46.

Schultz JR, and Rubin EM. The properties of HDL in genetically engineered mice. *Curr. Opin. Lipidol*.1994;5,126-137.

Secretaría de Salud, México. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2000. *Salud Pública de México* mayo-junio 2002;44(3) p. 276-279.

Secretaría de Salud, México. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2002. *Salud Pública de México* marzo-abril 2004;46(2) p. 175-176.

Segal P, Rifkind BM, and Schull WJ: Genetic factors in lipoprotein variation. *Epidemiol. Rev* . 1982;4:137.

Segrest JP, Garber DW, Brouillette CG, Harvey SC and Anantharamaiah GM. The Amphiphathic alfa helix: A multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins. *Adv- Protein Che*. 1994;45:303-369.

Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. An association analysis between ApoA1 polymorphisms and the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level and myocardial infarction (MI) in Japanese. *J. Human Genet.* 2004;49(8):433-9.

Shoulders CC, Kornblitt AR, Munro BS, Baralle FE. Gene structure of human apolipoprotein A1. *Nucleic Acids Res.* 1983;11(9):2827-2837.

Sorkin SC, Forestiero FJ, Hirata MH, Guzman EC, Cavalli SA, Bertolami MC, Salazar LA, Hirata RD. APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(12):1339-45.

Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003 ;21(6):577-81.

Tall AR, Breslow JL. Plasma high-density lipoproteins and atherogenesis. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. *Atherosclerosis and coronary artery disease*, vol. 7. Philadelphia, PA: Lippincott Raven, 1996:105-128.

Tall AR, Wang N. Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2000;106:1205-1207.

Temel RE, Walzem RL, Banka CL, Williams DL. Apolipoprotein A-I Is Necessary for the *in Vivo* Formation of High Density Lipoprotein. Competent for Scavenger Receptor BI-mediated Cholesteryl Ester-selective Uptake⁻. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, 2002;29: 26565-26572.

Todd-Sanford-Davidsohn. Diagnostico y tratamiento clinicos por el laboratorio. Capítulo 11. Lípidos y dislipoproteinemia. Págs. 227-254. Segal PS, Bachorik P, Rifkind BM, Levy RI. 8a. edición. Salvat Mexicana de Ediciones, S.A. de C.V. México. 1990.

Turkalp I, Cil Z, Ozkazanc D. Analytical performance of a direct assay for LDL-cholesterol: a comparative assessment versus Friedewald's formula. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2005 ;5(1):13-7.

Utermann G, Haas J, Steinmetz A, Paetzold R, Rall SC, Jr, Weisgraber KH, Jr Mahley RW. Apolipoprotein A-I Giessen (Pro 143 --- Arg), a mutant that is defective in activating lecithin-cholesterol acyltransferase. *Eur J Biochem* 1984;144:325-331.

Vollbach H, Heun R, Morris CM, Edwardson Ja, McKeith IG, Jessen F, Schulz A, Maier W, Kolsch H. APOA1 polymorphism influences risk for early-onset nonfamilial AD. *Ann Neurol.* 2005;58(3):436-41.

Von Eckardstein A, Funke H, Walter M, Altland K, Benninghoven A, Assmann G. Structural Analysis of Human Apolipoprotein A-I Variants. *The Journal of Biological Chemistry.* 1990;265(15):8610-8617.

Walldius G; Aastveit AH; Jungner I. Stroke mortality and the apoB/apoA-I ratio: results of the AMORIS prospective study. *J Intern Med.* 2006;259(3):259-66.

Walldius G, Jungner I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. *J Intern Med.* 2004;255(2):188-205. Review.

Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9774-9.

Weisgraber KH, Rall SC, Bersot TP, Apolipoprotein A-I Milano. Detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine for arginine substitution in the variant A-I. *Biol Chem* 1983; 258:2508-2513.

Whitfield JB, Martin NG. Plasma lipids in twins. Environmental and genetic influences. *Atherosclerosis*. 1983;48(3):265-77.

Williams PT, Dreon DM, Blanche PJ, Krauss RM. Variability of plasma HDL subclass concentrations in men and women over time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997(4):702-6.

Williamson R, Lee D, Hagaman J, and Maeda N. Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89, 7134-7138

World Health Organization-International Society of Hypertension: Guidelines for the management of hypertension, Guidelines Subcommittee. *J. Hypertens* 1999;17:151-183.

Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Fukayama H, Hirano C, Shimakura Y, Yamamoto N, Arinami T, Tsuchiya S, Hamaguchi H. Frequent occurrence of hypoalphalipoproteinemia due to mutant apolipoprotein A-I gene in the population: a population-based survey. *Hum Mol Genet*. 1999;8(2):331-6.

Yancey PG; Bortnick AE; Kellner-Weibel G; de la Llera-Moya M; Philips MC; Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(5):712-9. Review.

Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1985;822(3-4):267-87. Review.

Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of APOA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med*. 2006;84(4):276-94.

Zhu X, Wu G, Zeng W, Xue H, Chen B. Cysteine mutants of human apolipoprotein A-I: a study of secondary structural and functional properties. *J. Lipid Res*. 2005;46(6):1303-11.

Bases de datos consultadas:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

<http://ca.expasy.org/>

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=335

<http://www.hqmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=APOA1>

<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/LocInfo.cgi?LLID=335>

<http://www.sanger.ac.uk/>

<http://www.imdbase.jp>

ANEXOS.

ANEXO 1. Carta de consentimiento informado.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONTRIBUCIÓN DE LAS VARIANTES ALÉLICAS FUNCIONALES DE LOS GENES *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG4*, *SR-BI*, y *APOA1* EN LA VARIACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) (REF. 1518)

Yo _____ con No de Registro _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el proyecto para estudiar los genes del metabolismo de las HDL, que se llevará a cabo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. También es de mi conocimiento que puedo retirarme de este estudio en cualquier momento si así lo deseo. En caso que decidiera retirarme, la atención que recibo como paciente no se verá afectada.

Entiendo que la muestra de sangre que done para el proyecto servirá para estudiar los genes que pudieran estar relacionados con el metabolismo del colesterol, principalmente de las HDL. Se me ha explicado que esto no representa un riesgo adicional para mi salud. También se me ha explicado que en el futuro, este estudio podría ayudar a identificar posibles blancos terapéuticos para prevenir o mejorar la calidad de vida de pacientes con enfermedad cardiovascular.

Estoy consciente de que los resultados de la investigación son confidenciales y que se contestarán todas las dudas que pueda tener sobre el estudio.

Firma del Paciente _____

Firma del Investigador _____

Testigo 1 (firma) _____

Testigo 2 (firma) _____

México, D. F. a _____ de _____ del _____.

ANEXO 2. Oligonucleótidos para la amplificación del gen *APOA1*.

Región amplificada	Oligonucleótidos en dirección 5'→ 3'	Temperatura alineamiento °C	Producto amplificado (pb)
Exón 1	(S) CTTAAGTTCCACATTGCCAGGAC (A) GAGGCCCGGCCTGGGGCAAG	59	210
Exón 2	(S) CCCTTCTCCTCACCTGGCTG (A) GCCTCTGCCCAGGAGGGTGG	60	238
Exón 3	(S) GGTTTCTCACTGGCCCCCTC (A) GGCTTCAACATCATCCCACAGG	61	325
Exón 4 Parte 1	(S) CACTGCACCTCCGCGGACAG (A) GCGCAGCGCGTCCACATGGG	61	448
Exon 4 Parte 2	(S) CGCGCCAGAAGCTGCACGAG (A) GGAAACGTTTATTCTGAGCACCG	62	391

(S) Oligonucleótido sentido. (A) Oligonucleótido antisentido