

Prevalencia del genotipo ApoE y su asociación con niveles de lípidos
plasmáticos en una muestra representativa de estratos bajos de la ciudad
de Medellín

Manuel José Castilla Rincón

Estudiante de Biología

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Instituto de Biología
Medellín
2013

Prevalencia del genotipo ApoE y su asociación con niveles de lípidos
plasmáticos en una muestra representativa de estratos bajos de la ciudad
de Medellín

Manuel José Castilla Rincón
Estudiante de Biología

Gabriel Bedoya Berrío
Asesor

Ana Lucía Paez Vila
Ana Victoria Valencia Duarte
Jenny García Valencia
Juan Carlos Arango Viana
Coasesores

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Instituto de Biología
Medellín
2013

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCION

1.1 Generalidades de ApoE

La Apolipoproteína E (ApoE), es una proteína constitutiva de diferentes tipos de lipoproteínas, modula el metabolismo y la unión a los receptores LDL (*low density lipoprotein*) o a otros receptores de esta familia, adicionalmente, la ApoE juega un papel importante en el metabolismo y transporte de colesterol. [1]

ApoE es una de las cinco tipos de lipoproteínas de la sangre (A-E), es sintetizada principalmente en el hígado, pero también se expresa significativamente en el cerebro, donde es producida por los astrocitos [2], y es importante para el mantenimiento y reparación de la membrana [3].

El gen de la Apolipoproteína E (ApoE), está localizado en el brazo largo (q) del cromosoma 19, en el locus 13.2. Posee una longitud de 3.7 Kb y contiene cuatro exones y tres intrones [4]. Este gen tiene tres alelos diferentes conocidos como *E2*, *E3*, *E4*. Cada alelo, heredado de parte de uno de los padres de manera codominante y codifican una isoforma diferente de proteína [5]. Estas son conocidas como ApoE 2, ApoE 3 y ApoE 4 [6].

Codifica una proteína de 34 K-Da compuesta de 299 aminoácidos y con una masa molecular relativa de 34000 [7], el extremo carboxilo terminal de la ApoE es el principal sitio de unión a los lípidos y el extremo amino terminal, contiene los dominios de unión a los receptores y a la heparina/proteoglicanos.[1]

Las diferencias estructurales entre cada una de las isoformas se debe a la sustitución de aminoácidos en los residuos 112 y 158. Así la isoforma E3 presenta cisteína en el residuo 112 y arginina en el 158. En la isoforma E4 y E2, la arginina y la cisteína ocupan ambos residuos respectivamente, ApoE

contiene dos dominios funcionales de plegamiento independientes: un dominio 22-kDa N-terminal (residuos 1-119) y un dominio de 10-kDa C-terminal (residuos 222-299) El dominio N-terminal existe en el estado libre de lípidos como un conjunto de cuatro hélices anfipáticas y contiene la región de unión al receptor de LDL (residuos 136-150 en la hélice 4). El dominio C-terminal tiene una alta afinidad por los lípidos y es responsable de la unión de las lipoproteínas. [8].

Mientras que ApoE 3 es considerado la isoforma "wild type" en los seres humanos debido a su alta frecuencia alélica y la falta de una fuerte asociación con fenotipo de la enfermedad humana, ApoE 4 parece ser la forma ancestral desde la Arg en las posiciones de la secuencia 112 y 158, ya que, están muy conservados a través de casi todas las especies animales que poseen ApoE. [9]

ApoE se sintetiza con un péptido señal de 18 aminoácidos N-terminal que se somete a procesamiento intracelular antes de la secreción de una glicoproteína madura de 35 KDa que contiene 299 aminoácidos. La proteína está codificada por 3.6 Kpb. ApoE plasmática se origina predominantemente a partir de hígado y, en pequeña medida, pero funcionalmente, en los macrófagos. Al mismo tiempo, ApoE se expresa en una amplia variedad de otros tejidos incluyendo el cerebro, bazo, pulmón, glándula suprarrenal, ovario y riñones.[1]

Esta expresión amplia en distintos tejidos sugiere que ApoE participa en diversos procesos biológicos, ambos relacionados con metabolismo de los lípidos y relacionados con enfermedad cardiovascular. De hecho, el apoyo a este concepto ha surgido de los estudios que relacionan la ApoE a la inmunidad innata, la función normal del cerebro y una gran cantidad de enfermedades neurodegenerativas.[9] [6]

1.2 Genotipos de ApoE y asociación a enfermedades

La variación alélica en ApoE da lugar a seis genotipos diferentes con tres formas homocigóticas (E2/2, E3/3 y E4/4) y tres heterocigóticas (E2/3, E2/4 y E3/4) [10]

Las 3 isoformas ApoE 2, ApoE 3 y ApoE 4 difieren únicamente en las posiciones 112 y 158, pero estas diferencias afectan a la estructura de la proteína y a su unión a lípidos y a receptores [10].

ApoE 2 transporta lípidos menos eficientemente y su presencia se asocia con la hiperlipoproteinemia de tipo III, ApoE 4 se une preferencialmente a lipoproteínas de gran tamaño y está asociada con un moderado aumento en el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. La presencia de Arginina en la posición 2 afecta la conformación de la Arginina 61 (en el dominio N-terminal) que en esta isoforma interactúa con el Glutámico 255 del dominio C-terminal. Este tipo de interacción entre los dominios N y C terminal parece afectar a la estabilidad de la molécula que queda en un estado inestable denominado "molten globule" que podría influir en la patogenia del Alzheimer [11].

Los diferentes genotipos para la Apo-E han sido asociados con niveles diferenciales de lípidos, por ejemplo, poseer un alelo *E4* se ha asociado con concentraciones más altas de colesterol [12] Esto puede explicar la asociación de Apo-E *E4* con mayor riesgo cardiovascular [13].

El genotipo *E4/4* ha sido asociado con historia paterna de infarto del miocardio y el *E2/2*, con una frecuencia cinco veces menor de historia de infarto agudo del miocardio en los padres [14].

La probabilidad de encontrar una estenosis mayor del 20% en las coronarias es 2,4 veces mayor en mujeres con historia familiar y que poseen *E4* [15].

El *E4* ha sido asociado con un aumento de hasta cuatro veces el riesgo de enfermedad coronaria [16]

Las variantes de ApoE también se han encontrado asociadas con enfermedad de Alzheimer y otros procesos neurodegenerativos, se ha hallado sobrerrepresentación del alelo *E4* en casos esporádicos y familiares de Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío en diversas poblaciones [17].

Por otro lado, el alelo *E2* se considera un factor protector para enfermedad de Alzheimer esporádica. [18]

Con respecto a otros procesos neurodegenerativos, se han encontrado asociaciones débiles de enfermedad de Parkinson con los alelos *E2* y *E4* [19]

En demencia frontotemporal, el *E2* se considera un factor protector, es decir, la probabilidad de tener demencia frontotemporal es 3,6 veces mayor en personas que no tienen *E2* [20]

Se han descrito dos variantes funcionales del promotor del gen de la Apo-E, la -219 G/T y la -491 A/T; el alelo -219T ha sido asociado con un riesgo 2,4 veces mayor de demencia y que es independiente de la presencia de *E2* o *E4* [21]

La homocigocidad para -219G y tener el genotipo *E3/3*, aumenta el riesgo de deterioro cognitivo 8,8 veces [22].

La frecuencia de *E4* en los que desarrollan depósito de amiloide β después de trauma craneoencefálico es 52% comparado con 16% en quienes no los desarrollan [23] y el pronóstico es peor en los portadores de un *E4* [24].

La Apo-E parece tener un papel modulador de la respuesta inflamatoria sistémica y del sistema nervioso central [25].

Concentraciones biológicamente relevantes de la Apo-E suprimen la activación de microglia y la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y óxido nítrico [26].

1.3 Frecuencias alélicas y genotípicas de APOE en poblaciones

El genotipo *E3/3* es el más común en la mayoría de las poblaciones, excepto en los Huly de las montañas de Papua, Nueva Guinea, su frecuencia varía entre el 50 y el 70%. El alelo *E4* es el segundo en frecuencia y se encuentra entre el 5 y el 35%, mientras el *E2* está entre el 1 y el 15%. [27]

Las poblaciones japonesas, chinas y árabes tienen una frecuencia más alta de alelos *E3* que los caucásicos (85% vs. 79%), y los africanos tienen una mayor frecuencia del alelo *E4* que los caucásicos (30% vs 15%) [28].

El alelo *E2* presenta una frecuencia baja en árabes y en algunos indios nativos americanos [29] El alelo *E2* no se ha encontrado en una población indígena de Malasia y de México [30]. Tanto en Europa como en Asia, se ha descrito una tendencia a la disminución en la frecuencia de *E4* de norte a sur [31]. En el sur de Grecia, los alelos *E2* y *E4* se han encontrado entre 5,3 y 7% respectivamente [32] Curiosamente, las frecuencias en el nordeste griego son

semejantes a las de otros países europeos [33] Cifras semejantes a las del sur de Grecia se han descrito para el sur de Italia (Corbo, Scacchi et al. 1995)

Población	Alelos E2	E3	E4
Grecia	6.3%	80.7%	13.0%
Italia	6.6%	85.1%	8.3%
Japon	3.7%	84.6%	11.7%
Canada	7.8%	77.0%	15.2%
Alemania	7.7%	77.3%	15.0%
Estados Unidos	9.5%	75.6%	14.9%
Escocia	8.0%	77.0%	15.0%
Nueva Zelanda	12.0%	72.0%	16.0%

Tabla 1. Frecuencias alelicas para ApoE reportadas en diversas poblaciones. [34], [27, 33], [35]

1.4 Asociación de las variantes genóticas de ApoE con dislipidemias

Las dislipidemias son un conjunto de patologías caracterizadas por alteraciones en las concentraciones de los lípidos sanguíneos, componentes de las lipoproteínas circulantes, a un nivel que significa un riesgo para la salud. Es un término genérico para denominar cualquier situación clínica en la cual existan concentraciones anormales de colesterol: colesterol total (Col-total), colesterol de alta densidad (Col-HDL), colesterol de baja densidad (Col-LDL) o triglicéridos (TG) [36].

Una clasificación distribuye las dislipidemias en dos grupos, primarias o secundarias. Las dislipidemias primarias responden a mutaciones genéticas y se sospechan cuando se producen signos de dislipidemia en niños, en enfermedades ateroscleróticas prematuras (en menores de 60 años) y con

niveles de colesterol en sangre por encima de 6,2 mmol/L.[37] Las dislipidemias secundarias constituyen la mayoría de los casos de dislipidemia en adultos. La causa más frecuente es el estilo de vida sedentario con ingesta elevada de grasas saturadas (como la mantecas de origen animal, la carne de cerdo y otras) y colesterol; otras causas son el consumo excesivo de alcohol, la insuficiencia renal crónica, el hipotiroidismo, la cirrosis hepática primaria y algunos fármacos como las tiacidas, retinoides, antirretrovirales, estrógenos, progestágenos y glucocorticoides.[37]

Las hiperlipoproteinemias comprenden las alteraciones producidas por el aumento de las lipoproteínas. Existen varias causas de hiperlipoproteinemia, aunque en general se agrupan en 3 clases: dietéticas, que son en general leves; la genética, que puede ser grave y la secundaria a otros procesos o inducida por determinados fármacos. Las hiperlipoproteinemias no son un estado patológico único e individual, sino que se manifiestan como diversos tipos, cada uno de los cuales presenta características clínicas y metabólicas muy peculiares. (Tabla 2)[38]

Tipo/ Frecuencia	Anomalías lipídicas	Causas primarias	Secundarias	Características
I raro	Q(a)	Deficiencia familiar de lipoproteinlipasa	Lupus eritematoso sistémico DM (b)	Hepatoesplenomegalia, xantomas eruptivos y lipemia retiniana
Ila frecuente	LDL(c)	Hipercolesterolemia familiar (anomalías de los receptores de LDL)	Hipotiroidismo, síndrome nefrótico, glucocorticoides	Todas las edades: xantomas planos, tendinosos o tuberosos, existencia de parientes afectados, vasculopatías
Ilb frecuente	LDL y VLDL(d)	Hiperlipemia familiar	mixta DM, obesidad, hepatitis crónica, síndrome nefrótico, glucocorticoides,	Adultos: no hay xantomas, existencia de parientes afectados, vasculopatías

III	IDL(e)	Disbetalipoproteinemia familiar	tiazidas y propranolol DM, Hipotiroidismo, gammapatía monoclonal	Adultos: xantomas palmares tuberoeruptivos o de ambos tipos y vasculopatías
IV frecuente	VLDL	Hipertrigliceridemia familiar	DM, obesidad, uremia, síndrome nefrótico, alcoholismo stress, anticonceptivos orales	Adultos: no hay xantomas, concentraciones elevadas de glucosa y ácido úrico y vasculo-patías
V poco frecuente	Q y VLDL	Hipertrigliceridemia mixta familiar	DM, obesidad, alcoholismo, embarazo, anticonceptivos orales	Adultos: xantomas eruptivos, hepatoesplenomegalia, dolor abdominal/pancreatitis

(a)- Q= Quilomicrones (b)-DM= Diabetes mellitus (c)-LDL= Lipoproteínas de baja densidad

(d)- VLDL= Lipoproteínas de muy baja densidad (e)-LDL= Lipoproteínas de densidad intermedia

Tabla 2. Hiperlipoproteinemias [38]

Hipolipidemia es una disminución de las lipoproteínas de plasma causado por factores primarios (genética) o secundarios (adquiridos) por lo general es asintomática.

Hay tres raros trastornos primarios de hipolipidemia en los que están involucradas las mutaciones genéticas estas condiciones son: abetalipoproteinemia, hipobetalipoproteinemia y retención de quilomicrones [39].

Como ya se mencionó el alelo E2 se relaciona directamente con la disbetalipoproteinemia, pero además el alelo E4 se ha observado asociado con aumento de niveles plasmáticos de LDL y colesterol total en sujetos con otras dislipidemias. Adicionalmente, se ha observado que en sujetos con hiperlipoproteinemia de los tipo IIa, IIb, IV y V hay mayor frecuencia del alelo E4 que en los controles sanos [40]

La asociación de E4 con otros tipos de dislipidemias ha llevado a considerar que las variantes de ApoE puede tener un papel modulador en la expresión de lipoproteínas en algunos de estos trastornos y en otros hacer parte de los componentes causales [41].

Se han realizado estudios con muestras de población general de diversos países para determinar el efecto que pueden tener las variantes de ApoE en el perfil lipídico. En indígenas australianos el alelo E4 de ApoE se asoció a mayores concentraciones de triglicéridos y menores de HDL [42].

En Dinamarca, tener los alelos E2 y E4 se asoció con hipetrigliceridemia y el E4 con hipercolesterolemia. [43]

En el noroeste de Grecia, se observó que los que tenían el alelo E2 tenían más altos niveles de triglicéridos, pero menores de colesterol total, y no había impacto del alelo E4 en los niveles de lípidos [33].

En Portugal y Brasil, E4 se asoció con mayores niveles de colesterol y se encontró con mayor frecuencia en dislipidémicos [44].

1.5 Estudios realizados en Colombia.

En un estudio realizado en niños escolares en Quindío departamento de Colombia se encontró que el alelo más frecuente fue el E3 (91,6%), seguido de E2 (5,3%) y E4 (3,1%). En toda la población, el genotipo más común fue el E3/E3 (90,8%), seguido del E2/E3 (5,6%) y el E3/E4 (3,2%). No se encontraron homocigotos para E2/E2 y E4/E4 [46].

En el anterior estudio los analisis muestran que la distribución del alelo E3 y el genotipo E3/E3, fue más alta (90,8% y 91,6%, respectivamente) que la

encontrada para el mismo alelo en Venezuela (83%) (21), Corea (85,2%) y Grecia (80,7%), muy cercana a la encontrada en una población adulta en Bogotá, Colombia (87%) y en una población de escolares del centro oriente colombiano (86%). La distribución fue similar a la descrita en un grupo de adolescentes mexicanos (89,5%), una población indígena mexicana (90%) y una población mestiza mexicana (91,5%); en estas dos últimas poblaciones, no se encontraron homocigotos E2 y E4 al igual que en el anterior estudio realizado en Colombia. [46]

Además, este estudio muestra que el polimorfismo ApoE tiene un efecto significativo sobre los niveles de colesterol total y c-LDL (colesterol LDL) plasmáticos de los escolares quindianos. En los varones, el colesterol total y el c-LDL se distribuyeron de acuerdo con lo descrito en otras poblaciones y en otros grupos de la población colombiana, en los cuales se muestran bajos niveles de colesterol total y c-LDL y altos niveles de c-HDL. [46]

En Colombia, en 61 ancianos no dementes se encontró una frecuencia de *E4* de 8.2%, la cual es un poco más alta que en el sur de Europa, pero más baja que en Japón y en el norte de Europa [45]

2 HIPOTESIS

Existe asociación alélica y/o genotípica de ApoE con los niveles de lípidos en sangre y/o la presencia de hiperlipidemias en la población adulta de estratos socioeconomicos bajos del área urbana de la ciudad de Medellín (Antioquia)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la frecuencia de los diferentes alelos y genotipos de ApoE y evaluar su efecto sobre los niveles plasmáticos lipídicos en una muestra representativa de estratos bajos de la ciudad de Medellín.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de los alelos *E2*, *E3* y *E4* de la Apo-E en la población adulta de estratos socioeconomicos bajos del área urbana de Medellín (Antioquia)
- Determinar la frecuencia de los genotipos *E2/2*, *E2/3*, *E2/4*, *E3/3*, *E3/4* y *E4/4* de la Apo-E en la población adulta de estratos socioeconomicos bajos del área urbana de Medellín (Antioquia)
- Establecer si existe asociación de cada uno de los alelos y/o genotipos de ApoE con los niveles plasmáticos de colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la población adulta de estratos socioeconomicos bajos del área urbana de Medellín (Antioquia).
- Establecer si existe asociación entre cada uno de los alelos de ApoE con la presencia de hiperlipidemias en la población adulta de estratos socioeconomicos bajos del área urbana de Medellín (Antioquia)

4 METODOLOGIA

4.1 La población de Estudio.

Población blanco:

Población general adulta de estratos bajos del municipio de Medellín, Antioquia.

Criterios de Inclusión:

- Residir en Medellín, Antioquia
- Ser mayor de 18 años
- Aceptar participar en el estudio
- Los individuos no deben ser emparentados

Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se estableció empleando el programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados (EPIDAT) versión 3.1, con la sección para la estimación de una proporción en población infinita, con una confianza del 95% y prevalencia esperada del 50% (se desconoce cuál podría ser la proporción de cada genotipo en esta población), precisión del 3% y un efecto del diseño de muestreo de 1.5 (razón entre el error estándar del diseño empleado y el obtenido tratando la muestra como simple aleatoria. El valor superior a 1 indica que el uso de conglomerados produce una varianza superior), para un total de 854 sujetos.

Muestreo

Se realizó un muestreo probabilístico polietápico estratificado y de conglomerados. Se estratificó por nivel socioeconómico. El marco muestral se construyó tomando como soporte la información del Departamento Administrativo de Planeación Municipal, dada la información de las 16 comunas y su estrato socioeconómico. La unidad primaria de muestreo fue la manzana, la secundaria la vivienda y las personas adultas, la unidad final de análisis. Para la selección de las manzanas (conglomerados), estas se distribuyeron proporcionalmente por comunas y se asignó el estrato socioeconómico predominante del barrio según la estratificación de Empresas Públicas de Medellín. Para seleccionar las manzanas dentro de cada estrato, se utilizó un muestreo sistemático aleatorio ordenando las manzanas por la comuna a la que pertenecen y se utilizó una fracción de muestreo que se obtuvo de dividir el número de manzanas existentes entre el número de manzanas a seleccionar en ese estrato socioeconómico

Se seleccionaron las viviendas en cada manzana con muestreo sistemático aleatorio con un arranque aleatorio en la primera vivienda según la fracción de muestreo que se obtenga en cada manzana dividiendo el número de viviendas existentes por cinco. Se seleccionó al azar en la vivienda un sujeto mayor de 18 años.

4.2 Muestras biológicas

Se tomó muestra de 10 ml. sangre que se distribuyó en dos tubos: tres mililitros. en un tubo seco para la determinación de lípidos y siete ml. en un tubo con anticoagulante. De la sangre de este último tubo se extrajo el ADN que se usó en la genotipificación. Las muestras de sangre se tomaron entre las 7:00 AM y las 10:00 AM, y el sujeto debió estar en ayunas.

4.3 Determinación de lípidos plasmáticos

Se determinaron los niveles de colesterol total, triglicéridos y HDL por métodos enzimáticos empleando kits comerciales de Abbott en un analizador de química Architect CI-8200. Para el colesterol total se empleó oxidasa, para triglicéridos glicerol-fostato-oxidasa y para HDL detergente líquido selectivo. El LDL se estableció por cálculo.

4.4 Extracción de DNA

Se tomaron medidas de cuidado biológico para la manipulación de las muestras que consisten de 7 ml. de sangre periférica en tubos con EDTA. Estas, fueron almacenadas a 4°C. La extracción de DNA se hizo utilizando protocolos estándar de Fenol-Cloroformo. El ADN extraído fue resuspendido en buffer Tris EDTA, se prepararon alicuotas de trabajo y se almacenaron a -60°C.

4.5 Genotipificación de pòlimorfismos en APO E

La Apo-E se genotipificó usando PCR como la describieron Hixson y Vernier [47]. Un fragmento del exon 4 del gen de la Apo-E se amplificó y el producto se digirió mediante una endonucleasa de restricción (HhaI), que reconoce la secuencia guanidina-citocina-guanidina-citocina (GCGC). El ADN amplificado se corto en todos los sitios que contenían esta secuencia. El fragmento del exón 4 amplificado contenía 227 pares de bases (pb). El número de fragmentos cortados permitió la genotipificación del Apo-E. Por ejemplo, dos fragmentos invariables de 16 y 18 pb son comunes para todas las isoformas. El alelo *E3* tiene otras tres secuencias GCGC que serán cortadas y producirán fragmentos de 35, 48 y 91 pb. El alelo *E2* será cortado en cuatro sitios y se producirán fragmentos de 91, 81, 18 y 16 pb. El *E4* contiene seis secuencias GCGC. Los fragmentos que se producirán serán de 16, 18, 19, 35, 48 y 72 pb (figura 1).

Los primers que se usarán tendrán las siguientes secuencias: 5'-ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTA-3' y 5'-TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGC-3'.

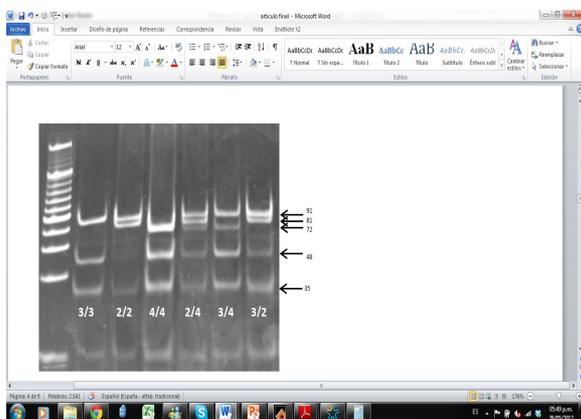


Figura 1. Gel de poliacrilamida al 18% para resolución de los genotipos de APOE. En la primera columna se encuentra el marcador de peso.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ l y se utilizaron 1.5 U de Taq polimerasa (5 U por μ l), un buffer para PCR sin magnesio que contiene 200 mM de tris-HCl, pH 8.4 y 500 mM de KCl, 1 mM de $MgCl_2$, 10% de dimetilsulfóxido y una mezcla de nucleótidos que contenga 0.2 mM de cada uno de cada dNTPs pH 7. 0.5 mM de cada primer, 5 μ l de DNA y se ajustó al volumen a 25 μ l con agua doblemente destilada. Se realizaron 35 ciclos de amplificación a 94 por 1 minuto, 64 °C por un minuto y 72 °C por un minuto, finalmente un paso adicional de elongación de los productos de amplificación a 72 °C por 10 minutos. La reacción fue visualizada mediante una electroforesis de gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio, se corrió 30 minutos a 80 voltios.

Para la digestión con HhaI se realizó el siguiente procedimiento: A 18 μ L del producto de amplificación se le adicionó un μ l (1 U) de HhaI, se incubó a 37 °C durante 18 horas y la discriminación de los genotipos se hizo en un gel de poliacrilamida 18% sometido a una electroforesis a voltaje constante de 85 V por tres horas y treinta y cinco minutos. La tinción de dicho gel se realizó utilizando una solución de Bromuro de Etidio (EtBr).

4.6 Análisis estadístico y cálculo de frecuencia Alélica y equilibrio de Hardy - Weinberg

Para la generación de estimaciones no sesgadas de todos los resultados, se analizaron los datos con el módulo para muestras complejas del programa estadístico SPSS versión 18,0, teniendo en cuenta el factor básico de expansión que es el recíproco de la probabilidad final de selección de las personas, la cual es el producto de las probabilidades de selección de cada etapa del muestreo. Las ponderaciones se multiplicaron entre sí y el factor

resultante se normalizó en función del tamaño de la muestra obtenida, dando lugar a la ponderación final.

Se calcularon promedios con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC95%) para las variables edad, colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL; y frecuencia y porcentajes para la variable sexo, alelos, genotipos de ApoE y presencia de dislipidemia. Se dicotomizaron los niveles de lípidos de la siguiente manera: Hipercolesterolemia = Colesterol > 240 mg/dl, HDL bajo = HDL < 40 mg/dl, LDL alto = LDL > 100 mg/dl e Hipertrigliceridemia = Triglicéridos >200 mg/dl.

La asociación de los diferentes alelos y genotipos de APOE con los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, LDL y HDL se evaluó mediante análisis de covarianza (ANCOVA), ajustando por edad, sexo y consumo de hipolipemiantes. No se encontraron interacciones significativas entre genotipos y alelos y cada una de las covariables. La evaluación de la asociación entre hiperlipidemia y cada uno de los alelos y genotipos de APOE se hizo mediante análisis de regresión logística binaria. Se hizo un modelo para los alelos y otro para los genotipos, y en cada uno se tomaron alelos y genotipos como variables dummy. Las covariables que se introdujeron en el modelo fueron edad y sexo. Para todos los análisis se tomó un nivel de significación de 0,05. El equilibrio de Hardy - Weinberg se realizó mediante una prueba de chi cuadrado con 3 grados de libertad y con un $\alpha = 0.05$

5 RESULTADOS

5.1 Característica de la muestra.

La muestra en estudio consistió en 953 personas que participaron voluntariamente en el estudio de ellas 99 fueron excluidas de los análisis ya que pertenecían a un grupo de estrato socioeconómico alto y al ser un número tan pequeño con respecto a la cantidad de personas pertenecientes al grupo de estratosocioeconómico bajo creaban cierto sesgo por este motivo fueron excluidas, a todos los individuos se les realizó una encuesta en la cual proporcionaron datos de interés para el estudio además de que proporcionaron muestras de sangre respectivas para realizar la extracción del ADN y para realizar el perfil lipídico.

5.2 Análisis estadístico

5.2.1 Características demográficas y antecedentes clínicos de adultos de estratos bajos y medios bajos de la ciudad de Medellín, 2009 – 2010

En la tabla 3 se consignan todos los datos obtenidos en el estudio mediante la encuesta realizada. La media de edad en el estudio fue de 45,07 años, las mujeres representaron el 66,2% de la muestra poblacional, se tuvieron en cuenta para el estudio el uso de hipolipemiantes y la presencia de enfermedades como hipertensión arterial, diabetes, dislipidemia enfermedad coronaria y el consumo de cigarrillo.

Tabla 3. Características demográficas y antecedentes clínicos de adultos de estratos bajos y medios bajos de la ciudad de Medellín, 2009 – 2010

Característica	Total (n = 854)			
	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Edad (años)	45,07	16,17	18	93
Escolaridad (años)	8,41	4,35	0	23

	Frecuencia	Porcentaje
Sexo femenino	565	66,2
Estado civil		
- Soltero	265	31,0
- Casado	298	34,9
- Unión libre	169	19,8
- Separado o divorciado	60	7,0
- Viudo	62	7,3

Estrato socioeconómico		
- 1 (Bajo-bajo)	108	12,6
- 2 (Bajo alto)	413	48,4
- 3 (Medio bajo)	333	39,0
Hipertensión arterial	162	19,0
Diabetes	32	3,7
Dislipidemia	163	19,1
Uso actual de hipolipemiantes	118	13,8
Enfermedad coronaria	34	4,0
Ha fumado cigarrillo	189	22,1

5.2.2 Niveles de lípidos según grupo de edad en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

Para analizar los niveles de lípidos se agruparon los individuos según su edad en 6 grupos diferentes de los cuales se obtuvo la media para la medición de Triglicéridos, HDL, LDL y Colesterol total, se obtuvo también una media total de la población para cada una de las medidas.

Tabla 5. Niveles de lípidos según grupo de edad en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

Categorías de edad	Triglicéridos		HDL		LDL		Coleste
	Media	IC95%	Media	IC95%	Media	IC95%	Media
• 18 a 29 años	120,0	108,0 132,0	- 42,3	40,6 43,9	- 105,5	100,2 110,9	- 171,9

• 30 a 39 años	160,2	124,4	-	45,5	37,5	-	102,8	97,6	-	180,0
• 40 a 49 años	201,2	177,2	-	33,4	25,6	-	107,1	92,6	-	180,5
• 50 a 59 años	154,4	131,8	-	39,3	37,4	-	115,2	105,1	-	186,7
• 60 a 69 años	191,7	175,0	-	41,8	39,3	-	125,4	116,9	-	205,6
• 70 años o más	191,8	175,7	-	41,1	38,2	-	104,4	89,6	-	183,8
Total de población	168,5	146,9	-	40,5	34,5	-	107,5	102,0	-	181,8
		190,0			46,5			113,1		

5.2.3 Frecuencias de los genotipos y alelos del gen de APOE en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

La tabla 4 resume las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en la muestra poblacional en estudio, aquí el genotipo más frecuente fue E3/E3 con un 79,4% seguido de E3/E4 con 10,1% y E2/E3 con 9,1% los demás genotipos fueron menos frecuentes, E2/E4 con 0,8% E4/E4 con 0,3% y E2/E2 con 0,2%. En cuanto a las frecuencias alélicas encontramos que la más común es E3 que abarca un 89,0%, E2 y E4 poseen frecuencias similares con 5,2% y 5,8% respectivamente.

Tabla 4. Frecuencias de los genotipos y alelos del gen de APOE en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

	Porcentaje	IC 95%
Genotipos		
• 2/2	0,2	0,1 a 0,8
• 2/3	9,1	4,6 a 17,0
• 2/4	0,8	0,3 a 2,5
• 3/3	79,4	68,3 a 87,3
• 3/4	10,1	6,2 a 16,1
• 4/4	0,3	0,1 a 1,6
Alelos		
• E2	5,2	2,7 a 9,6
• E4	5,8	3,6 a 9,3
• E3	89,0	82,7 a 93,2

5.2.4 Frecuencia Alélica y equilibrio de Hardy - Weinberg

Se obtuvo el valor de 7,8147 y comparando con los datos de la tabla de Chi cuadrado vemos que $6,815 < 7,8147$, y calculando el valor p vemos que este es de 0.08 por lo tanto podemos concluir que la población se encuentra en equilibrio de Hardy – Weinberg.

5.2.5 Niveles de lípidos y alelos de APOE en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

Los análisis de covarianza realizados para los niveles de lípidos y alelos de APOE muestra como la concentración media de LDL y Colesterol total en la población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín se ve significativamente influida por los alelos de APOE, los cuales tienen cada uno, una afinidad diferente por los receptores de LDL produciendo efectos notables en el metabolismo de estas lipoproteínas y por ende del colesterol total (ver Tabla 5) al presentar valores p menores al valor $\alpha = 0.05$ estos análisis fueron ajustados por edad, sexo y uso de hipolipemiantes.

Tabla 5. Niveles de lípidos y alelos de APOE en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

Genotipo APOE	2	3	4	F	p
	Frec. = 5,2%	Frec. = 89,0%	Frec. = 5,8%		
	Media (IC 95%)	Media (IC 95%)	Media (IC 95%)		
Triglicéridos	142,52 (113,96 171,07) 41,09	a 168,33 (154,93 181,73) 40,69	a 202,28 (156,72 247,85) 40,09	a 2,36	0,09
HDL	(38,31 43,86) 103,21	a (37,20 44,19) 106,73	a (37,86 42,33) 128,04	a 0,15	0,86
LDL	(90,82 115,60) 173,90	a (100,51 112,96) 181,08	a (117,16 138,92) 208,74	a 6,79	0,001
Colesterol total	(157,57 190,23)	a (174,08 188,07)	a (196,38 221,11)	a 9,34	<0,0001

* Ajustado por edad, sexo y uso de hipolipemiantes,

5.2.6 Niveles de lípidos y genotipos de APOE en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

Luego de realizar el análisis de covarianza ANCOVA entre los niveles de lípidos y genotipos de APOE se encontró que los genotipos de APOE estaban influyendo significativamente en la concentración media tanto de Triglicéridos como de HDL, LDL y Colesterol total, esto se puede constatar al contrastar los valores p (ver Tabla 4) con el valor α utilizado para este análisis el cual es de $\alpha = 0.05$ por lo tanto los genotipos de APOE influyen de manera significativa en las concentraciones medias plasmáticas de Triglicéridos, LDL, HDL y Colesterol total en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín. Podemos ver como la media para triglicéridos es mayor para el genotipo 3 /4 a su vez también resalta el valor de la media para HDL presente en para el genotipo 2/2 el cual es mucho mayor en contraste con los demás genotipos, también el valor de la media para triglicéridos y colesterol es notablemente mayor para el genotipo 4/4.

Tabla 6. Niveles de lípidos y genotipos de APOE en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

Genotipo	2/2	2/3	2/4	3/4	4/4	3/3		
APOE	Media	Media	Media	Media	Media	Media		
	(IC	(IC	(IC	(IC	(IC	(IC	F*	p
	95%)	95%)	95%)	95%)	95%)	95%)		
	194,0	135,6	164,9	203,8	230,2	168,0		
	8	4	9	5	2	3		
Triglicéridos	(114,30	(103,00	(140,62	(154,97	(194,04	(153,62	3,38	0,005
	7)	8)	6)	4)	9)	6)		
	50,26	40,40	42,87	40,05	37,29	40,75		
HDL	(44,72	(37,50	(36,57	(37,83	(32,90	(36,87	3,11	0,009
	a	a	a	a	a	a		
	55,80)	43,31)	49,17)	42,26)	41,69)	44,64)		
	77,69	96,68	149,7	121,2	197,0	106,6		
	(43,35	(83,28	6	3	5	3		
LDL	a	a	(117,3	(113,8	(177,5	(100,2	18,3	<0,000
	112,0	110,0	4 a	3 a	8 a	0 a	3	1
	3)	8)	182,1	128,6	216,5	113,0		
	171,6	168,7	9)	2)	1)	7)		
	5	1	7	4	4	6		
Colesterol total	(129,8	(153,3	(189,7	(192,8	(260,9	(172,9	15,7	<0,000
	4 a	3 a	0 a	4 a	4 a	4 a	8	1
	213,4	184,0	264,0	211,6	318,7	187,9		
	5)	8)	4)	3)	0)	7)		

- Ajustado por edad, sexo y uso de hipolipemiantes

5.2.7 Asociación de alelos del gen de APOE y dislipidemias en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

Al realizar la asociación alélica de APOE y dislipidemias en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín mediante el uso de una regresión logística binaria se encontraron resultados muy dicientes (ver Tabla 6), teniendo en cuenta que el alelo E 3 fue tomado como categoría de referencia debido a que se le considera como el alelo silvestre y no se le ha asociado a ninguna enfermedad según lo consultado en la literatura, encontramos que para la hipercolesterolemia poseer el alelo E 2 da una razón de 0,64 veces menos de padecerla con respecto a los que poseen E 3, y los que poseen alelos E 4 tienen una razón de 1,87 veces mas de padecerla que aquellos que poseen E 3.

En cuanto al HDL bajo las personas que poseen el alelo E 2 tienen una razón de 1,74 veces mas de contraer la enfermedad con respecto a los portadores de E 3 y las personas que poseen E 4 tienen una razón de 0.54 menos frecuente de contraer este tipo de dislipidemia con respecto a los portadores de la categoría de referencia.

El LDL alto tienen una razón de 4,20 veces mas de ser padecida por alguien que posea el alelo E 4 con relación a los que posean E 3 y una razón de 0.64 veces menos de padecimiento para portadores del alelo E 2 con relación al alelo usado como categoría de referencia.

La hipertrigliceridemia muestra como los portadores de los alelos E 2 y E 4 poseen razones de 0,43 y 0,65 veces menos de contraer la enfermedad que las personas que tengan un alelo E 3.

Todos estos resultados fueron ajustados por edad, sexo y uso de hipolipemiantes mediante regresión logística binaria pero ninguno tuvo significancia ya que todos los intervalos de confianza incluyen el uno.

Tabla 7. Asociación de alelos de gen de APOE y dislipidemias en población general de estratos socioeconómicos bajos de Medellín, 2009-2010.

Alelos	Hipercolesterolemia a Colesterol >240 mg/dl OR (IC95%)**	HDL bajo HDL < 40 mg/dl OR (IC95%)**	LDL alto LDL > 100 mg/dl OR (IC95%)**	Hipertrigliceridemia Triglicéridos < 200 mg/dl OR (IC95%)**
E 3*				
E 2	0,64 (0,23 a 1,85)	1,74 (0,51 a 5,99)	0,64 (0,16 a 2,61)	0,43 (0,14 a 1,32)
E 4	1,87 (0,75 a 4,63)	0,57 (0,21 a 1,58)	4,20 (1,61 a 10,96)	0,65 (0,26 a 1,59)

*Categoría de referencia

** Ajustado por edad, sexo y uso de hipolipemiantes mediante regresión logística binaria.

6 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con respecto a la frecuencia alélica y genotípica fueron similares a los esperados, la frecuencia alélica encontrada para E 3 fue de 0.89 muy similar a la reportada en un estudio realizado en la ciudad de Bogotá en una cohorte de individuos adultos sanos [48] ($E_3 = 0.87$), la frecuencia del alelo E3 es comparable con la identificada en Japón y Turquía (0.84; 0.88) y es ligeramente aumentada al compararla con alemanes (0.77), estadounidenses (0.76), finlandeses (0.69) y sudaneses (0.61). [49] [50], también es muy similar a frecuencias alélicas halladas en poblaciones latinoamericanas como las de México [51] y Brasil [48] aunque la reportada en este país fue un poco menor.

La gran prevalencia del alelo E 3 es un resultado previsto ya que es la variante más común respecto a este gen y su alta frecuencia persiste en la mayoría de las poblaciones alrededor del mundo de manera generalizada. [52]

La frecuencia del alelo E 2 concuerda con la que se encontró en un estudio realizado en el Quindío con una población de niños en edad escolar la cual fue de 0.053 similar a la encontrada por nosotros que fue de 0.052 y se acerca bastante a resultados hallados en una investigación realizada en Cundinamarca y el oriente colombiano también en niños en edad escolar donde se reportó una frecuencia alélica de 0.04 para E 2 [46] las frecuencias halladas en Brasil también son similares [48]

La frecuencia encontrada en el alelo E 4 puede ser comparada con la reportada en los niños escolares en Quindío pero es menor a la encontrada en población bogotana y del oriente del país [46]

Esto se puede explicar por la diferencia racial entre la población de Medellín y las de las Cundinamarca y los Santanderes en donde la ancestría amerindia es más prevalente que en Antioquia y en Quindío. [53]

Las frecuencias publicadas para los diferentes alelos de APOE en comunidades amerindias colombianas, parecen corroborar que la frecuencia más elevada del alelo e4 (18,1%), fuese debida al componente racial indígena.

[54]

Las frecuencias genotípicas halladas en este estudio fueron bastante similares a las encontradas en una población de niños en edad escolar del oriente colombiano. [55].

Las frecuencias genotípicas de E3/3 fueron similares a las encontradas en la población griega [33]. Las frecuencias encontradas para los genotipos E4/4 y E2/2, fueron muy bajas al igual que las reportadas en la población de niños mencionada anteriormente, un estudio similar en niños del departamento colombiano del Quindío corrobora esto, al presentar unos resultados similares [46].

Los niveles de lípidos encontrados en los grupos de edad en población general de estratos bajos de la ciudad de Medellín mostraron medias normales en forma general, solo el grupo de personas entre 40 y 49 años evidenciaron algunas anomalías en cuanto a niveles de Triglicéridos y HDL los cuales se salían un poco de los rangos de referencia establecidos no podemos atribuir estos cambios a ningún factor en específico por falta de datos acerca de esto, pero tal vez el factor medio ambiental tenga bastante influencia en los resultados.[56]

Según los resultados encontrados los genotipos de APOE influyen significativamente en las concentraciones plasmáticas de LDL, HDL, Triglicéridos y Colesterol en la población de estudio.

Los niveles mas bajos de colesterol fueron los que presentaron los individuos que poseían genotipos E2/2 y E2/3 siendo bastante cercanas las concentraciones de estos dos, a su vez los individuos con genotipos E2/2 presentaron también los niveles mas bajos de LDL seguidos por los encontrados en los que tenían genotipo E2/3,asimismo cabe destacar q los niveles mas altos encontrados tanto para Colesterol total como para LDL estaban presentes en los individuos con genotipos E4/4 y E 2/4, lo que podría indicar como la presencia del alelo E2 puede influenciar en la concentración de estos lípidos y lipoproteínas en nuestra población, corroborando los numerosos estudios efectuados en poblaciones normolipidemicas donde se ha observado la asociación del alelo E2 con niveles mas bajos de CT y LDL, mientras que el alelo E4 lo esta con cifras mas altas de estos dos parámetros. [57] [49].

El efecto promedio del alelo E2 mostró disminución en las concentraciones de las variables lipídicas que se relacionan con riesgo cardiovascular (colesterol total, LDL) y el del alelo E4 mostró aumento de las concentraciones de estas variables. [55].

Otros aspectos a tener en cuenta son por ejemplo, que el polimorfismo de la ApoE afecta el microambiente de la región de unión con el receptor LDL que se encuentra entre los aminoácidos 136 y 150, el cambio de la arginina por cisteína en la posición 158 del alelo E2 produce un cambio de la conformación que conlleva a la disminución del potencial electrostático que altera la unión de las lipoproteínas ApoE 2 con el receptor LDL. [58]

Esto permite que el alelo E2 presente una disminución en la unión con el receptor LDL con las lipoproteínas y, como consecuencia, una menor entrada de colesterol a la célula aumentando la producción de receptores LDL e incrementando la depuración de las lipoproteínas LDL, que conlleva a una disminución en las concentraciones de colesterol, en el alelo E4 ocurre lo contrario, como existe una captación aumentada de las lipoproteínas por el receptor LDL se presenta una entrada incrementada de lipoproteínas y, por lo tanto, de colesterol a la célula; esto resultaría en una disminución en la síntesis de receptores LDL y, por consiguiente, menos captación de partículas LDL con un aumento del LDL. [59] Este estudio sustenta esta hipótesis al encontrar como estas variables genóticas afectaban de manera similar las concentraciones de LDL y Colesterol total en sangre de la población en estudio. En la influencia de los genotipos sobre los niveles de HDL sucede algo similar donde los genotipos E2/2 y E2/4 presentan los niveles mas altos y el genotipo E4/4 presenta el mas bajo considerablemente menor al resto de las medias calculadas, lo que indicaría que la presencia del alelo E2 favorece niveles altos de HDL y la presencia del alelo E4 provoca una disminución de los mismos [60], pero al realizar el análisis entre frecuencias alélicas y niveles lipídicos encontramos que estos alelos aparentemente no tienen ningún efecto significativo sobre los niveles de HDL, debido tal vez a que el tamaño de muestra no fue suficiente para detectar algún tipo de efecto del genotipo de ApoE sobre las concentraciones plasmáticas de HDL, como se reportó también en estudios realizados en la ciudad de Bogotá [60]

Con los Triglicéridos sucedió algo similar a lo encontrado con HDL se halló efecto significativo entre sus niveles y la frecuencia genotípica de APOE donde los genotipos E4/4 y E3/4 presentaban niveles muy superiores a los de las demás medias pero al realizar la asociación entre frecuencias alélicas y estos niveles de Triglicéridos no se encontró influencia significativa.

Desde el trabajo pionero de Utermann, Pruin, y Steinmetz, un gran número de estudios han demostrado una relación entre el genotipo ApoE y los niveles plasmáticos de lípidos. Esta asociación fue muy coherente entre las poblaciones y niveles de colesterol y LDL. Sin embargo, varios de estos estudios carecen de suficientes herramientas y poder estadístico para establecer una relación firme con triglicéridos y HDL.[60]

Estos resultados tal vez indican la necesidad de realizar más estudios al respecto para poder esclarecer un poco la interacción.

7 CONCLUSIONES

- Se determinaron las frecuencias de los alelos E2 (5,2%) E3 (89,0%) y E4 (5,8%) para la población adulta de estratos socioeconomicos bajos del área urbana de Medellín, los cuales fueron similares a los hallados en otras poblaciones del país y del mundo.
- Se determinó la frecuencia para cada uno de los genotipos de APOE E2/2 (0,2%), E2/3 (9,1%), E2/4 (0,8%), E3/3 (79,4%), E3/4 (10,1%) y E4/4 (0,3%) para la población adulta de estratos socioeconomicos bajos del área urbana de Medellín, las frecuencias genotipicas se asemejan a las encontradas para poblaciones similares consultados en la literatura.
- Se observa una asociación del alelo E4 con niveles altos de LDL y niveles bajos de HDL.

8 BIBLIOGRAFÍA.

1. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
2. Havel, R.J., N. Yamada, and D.M. Shames, *Role of apolipoprotein E in lipoprotein metabolism*. Am Heart J, 1987. **113**(2 Pt 2): p. 470-4.
3. Becher, J.C., et al., *The distribution of apolipoprotein E alleles in Scottish perinatal deaths*. J Med Genet, 2006. **43**(5): p. 414-8.
4. Davignon, J., R.E. Gregg, and C.F. Sing, *Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis*. Arteriosclerosis, 1988. **8**(1): p. 1-21.
5. Mahley, R.W. and S.C. Rall, Jr., *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. **1**: p. 507-37.
6. Mahley, R.W., K.H. Weisgraber, and Y. Huang, *Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S183-8.
7. Stakias, N., et al., *Lower prevalence of E 4 allele of apolipoprotein E gene in healthy, longer-lived individuals of Hellenic origin*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. **61**(12): p. 1228-31.
8. Eto, M., K. Watanabe, and K. Ishii, *Reciprocal effects of apolipoprotein E alleles (E 2 and E 4) on plasma lipid levels in normolipidemic subjects*. Clin Genet, 1986. **29**(6): p. 477-84.
9. Hauser, P.S., V. Narayanaswami, and R.O. Ryan, *Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology*. Prog Lipid Res. **50**(1): p. 62-74.
10. Hatters, D.M., C.A. Peters-Libeu, and K.H. Weisgraber, *Apolipoprotein E structure: insights into function*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(8): p. 445-54.
11. Bu, G., *Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(5): p. 333-44.

12. Dallongeville, J., et al., *Apolipoprotein E polymorphism association with lipoprotein profile in endogenous hypertriglyceridemia and familial hypercholesterolemia*. *Arterioscler Thromb*, 1991. **11**(2): p. 272-8.
13. Gerdes, L.U., *The common polymorphism of apolipoprotein E: geographical aspects and new pathophysiological relations*. *Clin Chem Lab Med*, 2003. **41**(5): p. 628-31.
14. Tiret, L., et al., *ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(10): p. 1617-24.
15. Chen, Q., et al., *APOE polymorphism and angiographic coronary artery disease severity in the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study*. *Atherosclerosis*, 2003. **169**(1): p. 159-67.
16. Peng, D.Q., et al., *Gene-gene interaction of PPARgamma and ApoE affects coronary heart disease risk*. *Int J Cardiol*, 2003. **92**(2-3): p. 257-63.
17. Strittmatter, W.J., et al., *Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(5): p. 1977-81.
18. Corder, E.H., et al., *Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease*. *Nat Genet*, 1994. **7**(2): p. 180-4.
19. Huang, X., P.C. Chen, and C. Poole, *APOE-[E]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease*. *Neurology*, 2004. **62**(12): p. 2198-202.
20. Bernardi, L., et al., *The effects of APOE and tau gene variability on risk of frontotemporal dementia*. *Neurobiol Aging*, 2006. **27**(5): p. 702-9.
21. Heijmans, B.T., et al., *Association of APOE E2/E3/E4 and promoter gene variants with dementia but not cardiovascular mortality in old age*. *Am J Med Genet*, 2002. **107**(3): p. 201-8.
22. Strandberg, T.E., et al., *Interaction of herpesviridae, APOE gene, and education in cognitive impairment*. *Neurobiol Aging*, 2005. **26**(7): p. 1001-4.

23. Horsburgh, K., et al., *beta-amyloid (Abeta)42(43), abeta42, abeta40 and ApoE immunostaining of plaques in fatal head injury*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2000. **26**(2): p. 124-32.
24. Graham, D.I., et al., *Apolipoprotein E and the response of the brain to injury*. *Acta Neurochir Suppl*, 1999. **73**: p. 89-92.
25. Lynch, J.R., et al., *APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(49): p. 48529-33.
26. Laskowitz, D.T., et al., *Downregulation of microglial activation by apolipoprotein E and ApoE-mimetic peptides*. *Exp Neurol*, 2001. **167**(1): p. 74-85.
27. Eto, M., K. Watanabe, and K. Ishii, *A racial difference in apolipoprotein E allele frequencies between the Japanese and Caucasian populations*. *Clin Genet*, 1986. **30**(5): p. 422-7.
28. Arai, H., et al., *Polymorphisms of apolipoprotein e and methylenetetrahydrofolate reductase in the Japanese population*. *J Atheroscler Thromb*, 2007. **14**(4): p. 167-71.
29. Al-Khedhairi, A.A., *Apolipoprotein E polymorphism in Saudis*. *Mol Biol Rep*, 2004. **31**(4): p. 257-60.
30. Seet, W.T., T.J. Mary Anne, and T.S. Yen, *Apolipoprotein E genotyping in the Malay, Chinese and Indian ethnic groups in Malaysia-a study on the distribution of the different ApoE alleles and genotypes*. *Clin Chim Acta*, 2004. **340**(1-2): p. 201-5.
31. Corbo, R.M., et al., *Apolipoprotein B, apolipoprotein E, and angiotensin-converting enzyme polymorphisms in 2 Italian populations at different risk for coronary artery disease and comparison of allele frequencies among European populations*. *Hum Biol*, 1999. **71**(6): p. 933-45.
32. Sklavounou, E., et al., *Apolipoprotein E polymorphism in the Greek population*. *Clin Genet*, 1997. **52**(4): p. 216-8.
33. Liberopoulos, E., et al., *Apolipoprotein E polymorphism in northwestern Greece: frequency and effect on lipid parameters*. *Ann Clin Lab Sci*, 2004. **34**(3): p. 347-54.
34. Corbo, R.M., et al., *Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing*

- technique. Comparison with frequency data of other European populations. Ann Hum Genet, 1995. 59(Pt 2): p. 197-209.*
35. Sing, C.F. and J. Davignon, *Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. Am J Hum Genet, 1985. 37(2): p. 268-85.*
 36. Frick, M.H., et al., *Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. N Engl J Med, 1987. 317(20): p. 1237-45.*
 37. Miguel Soca, P.E., *Dislipidemias. ACIMED, 2009. 20: p. 265-273.*
 38. Robles Martnez-Pinillo, J.A., R. Hernandez Hernandez, and R. Fonte Villaln, *Diagnstico y tratamienton de las hiperlipoproteinemias. Revista Cubana de Medicina General Integral, 1999. 15: p. 461-472.*
 39. Elmehdawi, R., *Hypolipidemia: a word of caution. Libyan J Med, 2008. 3(2): p. 84-90.*
 40. Ghiselli, G., et al., *Increased prevalence of apolipoprotein E4 in type V hyperlipoproteinemia. J Clin Invest, 1982. 70(2): p. 474-7.*
 41. Pei, W.D., et al., *Apolipoprotein E polymorphism influences lipid phenotypes in Chinese families with familial combined hyperlipidemia. Circ J, 2006. 70(12): p. 1606-10.*
 42. Shaw, J.T., et al., *Apolipoprotein E polymorphism in indigenous Australians: allelic frequencies and relationship with dyslipidaemia. Med J Aust, 1999. 170(4): p. 161-4.*
 43. Frikke-Schmidt, R., et al., *Apolipoprotein E genotypes predict attendance rates at lipid clinic. Atherosclerosis, 2000. 153(2): p. 461-8.*
 44. Rodrigues, M.O., et al., *APOE genotypes and dyslipidemias in a sample of the Portuguese population. Clin Chem Lab Med, 2005. 43(9): p. 907-12.*
 45. Arboleda, G.H., et al., *Apolipoprotein E genotyping in a sample of Colombian patients with Alzheimer's disease. Neurosci Lett, 2001. 305(2): p. 135-8.*
 46. Landazuri, P., et al., *[Gender, age and plasma lipids differences associated with apolipoprotein E polymorphism in school children]. Biomedica, 2009. 29(3): p. 382-91.*

47. Hixson, J.E. and D.T. Vernier, *Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI*. J Lipid Res, 1990. **31**(3): p. 545-8.
48. De Franca, E., J.G. Alves, and M.H. Hutz, *Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipid levels in Brazilian children*. Hum Biol, 2004. **76**(2): p. 267-75.
49. Hallman, D.M., et al., *The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations*. Am J Hum Genet, 1991. **49**(2): p. 338-49.
50. Kamboh, M.I., et al., *Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanics and non-Hispanic whites*. Atherosclerosis, 1993. **98**(2): p. 201-11.
51. Medina-Urrutia, A.X., et al., *Apolipoprotein E polymorphism is related to plasma lipids and apolipoproteins in Mexican adolescents*. Hum Biol, 2004. **76**(4): p. 605-14.
52. Fullerton, S.M., et al., *Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(4): p. 881-900.
53. Rojas, W., et al., *Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers*. Am J Phys Anthropol. **143**(1): p. 13-20.
54. Jaramillo-Correa, J.P., et al., *Population genetic analysis of the genes APOE, APOB(3'VNTR) and ACE in some black and Amerindian communities from Colombia*. Hum Hered, 2001. **52**(1): p. 14-33.
55. Callas, N., et al., *[Genetic polymorphism of the E apolipoprotein in school age children: comparison with levels of plasma lipids and apolipoproteins]*. Biomedica, 2007. **27**(4): p. 526-36.
56. Corella, D., et al., *Environmental factors modulate the effect of the APOE genetic polymorphism on plasma lipid concentrations: ecogenetic studies in a Mediterranean Spanish population*. Metabolism, 2001. **50**(8): p. 936-44.

57. Utermann, G., N. Pruin, and A. Steinmetz, *Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man*. Clin Genet, 1979. **15**(1): p. 63-72.
58. Lund-Katz, S., et al., *Effects of polymorphism on the microenvironment of the LDL receptor-binding region of human ApoE*. J Lipid Res, 2001. **42**(6): p. 894-901.
59. Utermann, G., *Apolipoprotein E polymorphism in health and disease*. Am Heart J, 1987. **113**(2 Pt 2): p. 433-40.
60. Dallongeville, J., S. Lussier-Cacan, and J. Davignon, *Modulation of plasma triglyceride levels by ApoE phenotype: a meta-analysis*. J Lipid Res, 1992. **33**(4): p. 447-54.

61. Torres, Ana Lucia, Guerra de Muñoz, et al. (2005). *Modulación de los niveles de lípidos y lipoproteínas por el polimorfismo de la apolipoproteína E en individuos sanos de Bogota D.C. Nova*, enero-junio, 31-36.