

**TRABAJO PRESENTADO PARA ACCEDER AL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN QUÍMICA**

***“METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS GENÓMICO
DE LA
HIPOALFALIPOPROTEINEMIA”***

TRIBUNAL:

Dra. Patricia Esperón (Tutor)

Dr. Mario Stoll (Asesor externo)

Dra. Stella Raymondo

Dra. Cristina Servetto

Dr. Walter Alallón

**Q.F. Marcelo Vital
Diciembre 2008**

INDICE

1- RESUMEN	4
2- INTRODUCCIÓN	5
a) Lipoproteínas	6
b) Estructura de las HDL	6
c) Metabolismo de las HDL	6
d) Función de las HDL	10
e) Genes candidatos en las alteraciones del metabolismo de las HDL	13
f) Factores genéticos de riesgo para la enfermedad coronaria	23
3- OBJETIVO	24
4- MATERIALES Y MÉTODOS	
a) Juego de primers para amplificar en el gen apoA1	26
b) Juego de primers para amplificar en el gen ABCA1	26
c) Juego de primers para amplificar en el gen LCAT	26
d) Juego de primers para amplificar en el gen ECA	27
e) Juego de primers para amplificar en el gen ApoE	27
f) Amplificación en el gen MTHFR	27
5- MÉTODOS	
a) Extracción de ADN	27
b) Cuantificación de la concentración de las soluciones de ADN	27
c) Amplificación de ADN por la técnica de PCR.	28
d) Análisis de los productos de PCR en geles de agarosa	28
e) Purificación de fragmentos de ADN amplificados	28

f) Análisis en geles de poliacrilamida	29
g) Determinación de los pesos moleculares de los fragmentos	29
h) Secuenciación de los fragmentos	29
i) Análisis de las secuencias	30
j) Análisis de genotipos	30
6- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
a) Análisis del gen apoA1	33
b) Análisis de los exones 23 y 49 del gen ABCA1	38
c) Análisis de los exones 1 y 6 del gen LCAT	39
d) Análisis de los alelos de riesgo de ApoE, ECA y MTHFR	41
7- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	50
8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMEN

La hipoalfalipoproteinemia se define como un trastorno que afecta al metabolismo de las partículas de HDL, alterando su composición, concentración y el tamaño de las mismas. El término hipoalfalipoproteinemia primaria corresponde a concentraciones plasmáticas de HDL-C por debajo del percentil 10 con un componente genético.

El bajo HDL es uno de los factores de riesgo aterogénico mejor conocidos y forma parte de las dislipemias más comunes generadoras de enfermedades cardiovasculares en la población occidental. En las últimas 6 décadas, estas enfermedades son la principal causa de muerte en nuestro país. Se sabe que existe una relación inversa entre los niveles plasmáticos de las lipoproteínas de alta densidad y el riesgo de cardiopatía isquémica. Se calcula que entre 40 y 60% de la variación en los niveles de las HDL está determinada genéticamente y existe evidencia de que son varios los genes que podrían participar en la regulación de este rasgo fenotípico.

Se sabe cuáles son las causas genéticas de esta patología. La ApoAI es la apolipoproteína más importante del HDL constituyendo el 70 % de su masa proteica, siendo el gen apoAI uno de los candidatos más importantes para estudiar la variabilidad genética de los niveles de HDL. Una causa más rara de deficiencia de HDL se debe a mutaciones en el transportador de membrana ATP Binding Cassette 1 (ABCA1). Esta proteína interactúa directamente con la ApoAI para promover el flujo de colesterol celular. Otro gen candidato es el que codifica la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT). Esta enzima es la encargada de esterificar el colesterol de las HDL para generar las partículas maduras. Estas tres moléculas, ApoAI, ABCA1 y LCAT, parecen tener un papel fundamental en el transporte reverso del colesterol desde las células periféricas hacia el hígado y otros tejidos.

Nuestro objetivo ha sido elaborar una metodología que contribuya al conocimiento de los componentes genéticos de la hipoalfalipoproteinemia primaria. Esto representa un campo enorme de investigación de vital importancia para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis y la cardiopatía isquémica en nuestro país.

INTRODUCCIÓN

Los avances de la genética molecular y su aplicación a la medicina están jugando un papel cada vez más importante en la prevención de enfermedades, especialmente en algunas áreas, como son las enfermedades cardiovasculares. Los análisis genéticos pueden servir para estudiar el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, hacer el diagnóstico del tipo específico de afección y prevenir su desarrollo.

Las enfermedades del aparato circulatorio ocupan, desde la segunda mitad del siglo XX, el primer lugar entre las causas de muerte en nuestro país. Este grupo de enfermedades (30-40% del total de defunciones en los últimos 10 años) supera a la mortalidad por cáncer (20-25% en igual período) y por accidentes (<10%).

Se sabe que los niveles alterados de las lipoproteínas plasmáticas son poderosos factores de riesgos en la enfermedad cardiovascular (CVD). El papel protector de las partículas de HDL en la aterosclerosis, se debe principalmente a su implicancia en el transporte reverso de colesterol, mecanismo clave para eliminar el exceso de colesterol vía hepática. El metabolismo de las HDL es un proceso extremadamente complejo en el que las partículas realizan un intercambio continuo y dinámico de sus componentes con el resto de las lipoproteínas plasmáticas, y en el que intervienen un gran número de apolipoproteínas, receptores, transportadores y enzimas diferentes (Cenarro et al, 2004).

Lipoproteínas

Durante la digestión, las grasas complejas se descomponen en sus partículas elementales para poder atravesar la membrana intestinal y ser absorbidas eficazmente. Los ácidos grasos de menos de 12 átomos de carbono pasan directamente a la sangre y son transportados al hígado donde se utilizan para producir energía. Los ácidos grasos de más grandes deben unirse a moléculas de proteínas (apolipoproteínas), fosfolípidos y colesterol formando grandes moléculas que se denominan lipoproteínas para ser transportadas a través del plasma.

Las lipoproteínas se clasifican de acuerdo a sus propiedades físicas en cinco tipos: quilomicrones (partículas lipídicas de gran tamaño y baja densidad), VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), LDL (lipoproteínas de baja densidad) y HDL (lipoproteínas de alta densidad).

La composición de las lipoproteínas se resume en la siguiente tabla (Lusis A, 2001):

(%)	Quilomicrón	VLDL	LDL	HDL
Triglicéridos	9	6	11	8
Proteínas	18	19	21	20
Fosfolípidos	22	23	22	22
Colesterol	51	52	46	50

Estructura de las HDL

Las HDL son complejos macromoleculares, pseudomicelares, constituidos por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y por apolipoproteínas. Los lípidos anfipáticos se organizan en una monocapa en la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso. La estabilidad de esta monocapa está garantizada por las apolipoproteínas. Los lípidos no polares son insolubles en un medio acuoso como el plasma y en consecuencia se sitúan en el interior de las lipoproteínas, evitando así las interacciones con grupos polares, fisicoquímicamente desfavorable (figura 1). Las HDL son las lipoproteínas con mayor proporción proteica (55-60% de su masa seca), siendo la ApoAI la apolipoproteína más abundante. Se han descrito varias subclases de HDL en función de sus características fisicoquímicas y funcionales. Una clasificación basada en la densidad de flotación (r), las distingue en HDL₂ ($1.063 < r < 1.12$ g/mL) ricas en lípidos hidrofóbicos y las HDL₃ ($1.12 < r < 1.21$ g/mL) formadas principalmente por fosfolípidos y proteínas.

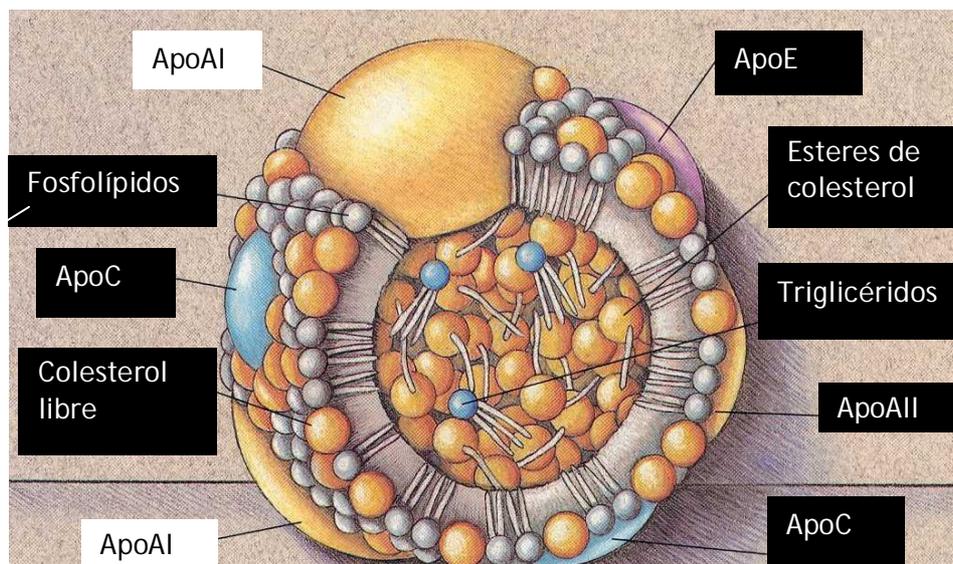


Figura 1: Estructura de la partícula de HDL donde se encuentran indicados sus principales componentes.

Las HDL migran en su mayoría dentro de la fracción α del plasma, por lo que también se las identifican como α -lipoproteínas. Otras subfracciones de HDL, compuestas esencialmente de fosfolípidos y ApoAI, por su movilidad electroforética en combinación con su tamaño, se denominan pre- β 1.

Metabolismo de las HDL

Las HDL tienen un origen no establecido aún claramente especialmente en lo que se refiere al tráfico intracelular del colesterol por lo que se han identificado dos probables fuentes de estas lipoproteínas. Por un lado, se sugiere que tanto el hígado como el intestino, son los que

forman las partículas discoidales (pequeña bicapa fosfolipídica rodeada de apolipoproteínas) llamadas HDL nacientes. Su apolipoproteína característica es la ApoA1 aunque las HDL de origen hepático suelen llevar también apoA-II, apoC y apoE. Las partículas iniciales discoidales son pobres en lípidos. La transformación de estas partículas discoidales en esféricas se realiza mediante la captación de colesterol y fosfolípidos y la posterior esterificación del colesterol (pase de HDL₃ a HDL₂).

Otra posible ruta de síntesis es la lipólisis de partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos (que incluyen a los quilomicrones y la VLDL) o de los tejidos. Esta hipótesis de lipólisis plasmática sería la más aceptada dada la fuerte correlación entre lipólisis plasmática y concentración de colesterol de las HDL (HDL-C). En el caso de los quilomicrones y VLDL, el proceso es consecuencia de la pérdida de triglicéridos de estas partículas por la acción de la lipoprotein lipasa (LPL) (Fig. 2). Al disminuir el tamaño de estas partículas, sus componentes de superficie quedan en exceso, y son transferidos a las HDL para luego ser esterificados por la acción de la LCAT (lecitina-colesterol acyl transferasa). En el caso de la captación del colesterol tisular, intervienen las caveolinas, proteínas que se encuentran en las invaginaciones de la membrana celular, y las ABCA1 (ATP-binding-cassette transporter A1 type) o CERP (proteína reguladora del flujo de colesterol), proteínas que transportan el colesterol desde el interior celular a la membrana regulando el flujo del colesterol hacia el exterior celular, (Sánchez de Medina, 2000).

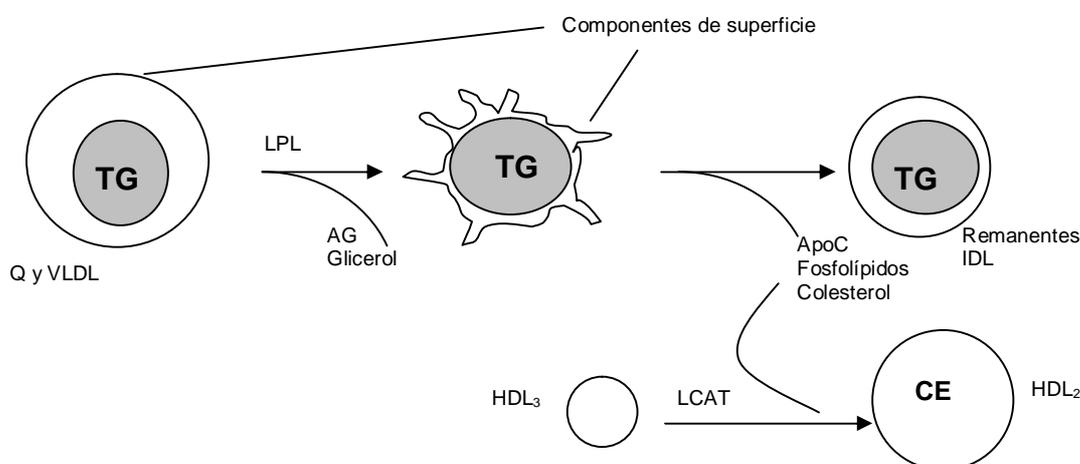


Figura 2: Esquema del metabolismo de las HDL desde su nacimiento hasta la formación de la partícula de HDL2 madura. TG: triglicéridos, Q: quilomicrón, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad, LPL: lipoproteinlipasa, AG: ácido graso, CE: ésteres de colesterol, LCAT: lecitina-colesterol acyl transferasa

Por otra parte, la CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol) realiza el intercambio de colesterol esterificado de las HDL por triglicéridos de las partículas que contienen apoB en su superficie (VLDL y LDL). Así, las HDL se enriquecen progresivamente en triglicéridos

mientras que las VLDL y LDL se enriquecen en colesterol esterificado. Las HDL₂ vuelven a originar HDL₃ o incluso se convierten en partículas de HDL nacientes. Las HDL₂ ricas en triglicéridos constituyen un buen sustrato para la lipasa hepática (LH), que hidroliza dichos triglicéridos así como los fosfolípidos superficiales, favoreciendo la cesión de colesterol desde dicha superficie al interior de las células hepáticas, junto a glicerol, ácidos grasos y lecitina. De esta forma, las HDL pueden ser captadas por el hígado a través de los receptores SR-B1 (scavenger receptor class B type I) o por la cadena β de la ATP sintasa (Fredenrich et al, 2003) (Figura 3). A diferencia de las lipoproteínas que contienen apoB, como las LDL, las partículas de HDL tienen componentes que son intercambiables por proteínas plasmáticas. Así, los lípidos y las proteínas que son componentes de las HDL pueden ser catabolizados por distintas vías. Se sabe que la ApoA1 puede ser captada por el riñón (mediante las cubilinas y las megalinas), y las moléculas de ésteres de colesterol pueden ser captadas por las glándulas adrenales y el hígado (Sánchez de Medina, 2000).

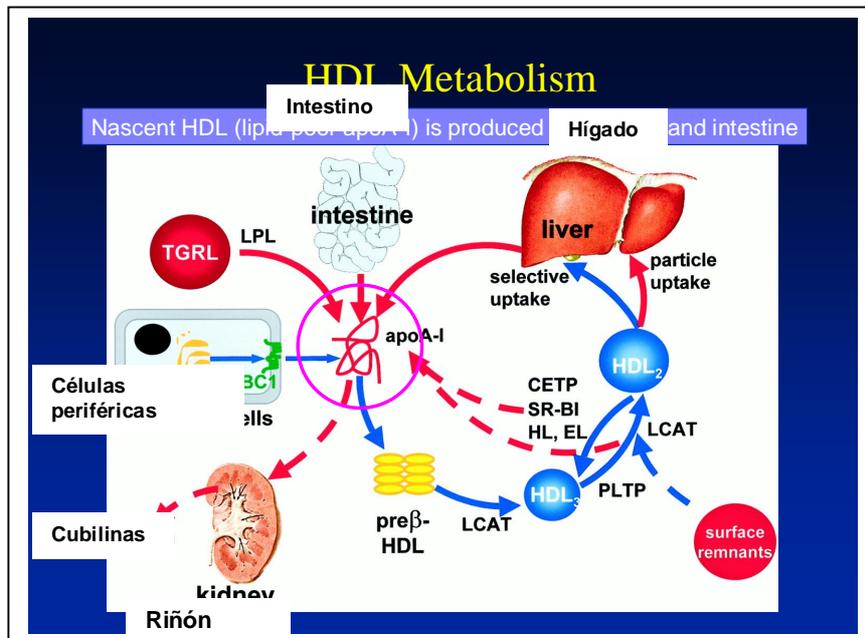


Figura 3: Principales etapas del metabolismo de las HDL. TGRL: lipoproteínas ricas en triglicéridos (Q y VLDL), LPL: lipoproteinlipasa, LCAT: lecitina-colesterol acyl transferasa, PLTP: proteína transferidora de fosfolípidos, HL: lipasa hepática CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol, ABC: transportador ATP binding cassette, SR-B1: scavenger receptor class B type I).

Existen diversos trastornos que afectan al metabolismo de las partículas de HDL, alterando su composición, concentración y el tamaño de las mismas. Estos se pueden englobar en 2 grandes grupos: Hipoalfalipoproteinemias o Hiperalfalipoproteinemias.

El término hipoalfalipoproteinemia corresponde a concentraciones plasmáticas de C-HDL por debajo del percentil 10. En Estados Unidos, en su último panel de expertos para el tratamiento de adultos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol, se considera un factor de riesgo de aterosclerosis niveles de HDL-C por debajo de 40 mg/dL. Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado consistentemente que los niveles bajos de HDL-C son un factor de riesgo independiente de enfermedad aterosclerótica coronaria siendo comúnmente el factor de riesgo lipídico que mejor correlaciona con el riesgo de aterosclerosis coronaria. (Moss AJ, et al. 1999), (Wilson PW et al, 1980) y (Assmann G, et al 1996).

Las hipoalfalipoproteinemias pueden ser primarias, o secundarias. Dentro de las hipoalfalipoproteinemias primarias se destacan la enfermedad de Tangier, déficit de LCAT o enfermedad de ojos de pez, donde sus principales manifestaciones clínicas son anemia y opacidad córnea. También se encuentran déficit de ApoA1 e Hipoalfalipoproteinemia Familiar con síntomas característicos como la aterosclerosis prematura.

Dentro de las hipoalfalipoproteinemias secundarias destacamos:

- asociadas a hipertrigliceridemias secundarias (DM, alcohol, insuf. renal)
- asociadas a factores exógenos reductores de HDL-C (obesidad, tabaquismo, fármacos)
- ingesta pobre en grasas
- enfermedad inflamatoria o infecciosa aguda y crónica (sepsis, HIV, artritis reumatoide).

Es importante tener en cuenta que los bajos niveles de HDL-C son el resultado de varias situaciones proaterogénicas, por lo que no es un factor de riesgo aislado e independiente.

Función de las HDL

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que el colesterol transportado en las partículas de HDL se relaciona de forma intensa, inversa e independiente con el riesgo de enfermedad aterosclerótica, especialmente de enfermedad coronaria prematura.

Transporte reverso de colesterol

Cuando la cantidad de colesterol intracelular es mayor que la capacidad de almacenamiento, el exceso es bombeado hacia el plasma, desde donde es llevado por las HDL al hígado para su excreción o reciclaje por un proceso denominado el transporte reverso de colesterol (TRC). Los enterocitos y macrófagos son los tipos celulares que están más expuestos a grandes cantidades de colesterol proveniente de la dieta y del suero. El pool de colesterol hepático está influido por diferentes variables, desde la absorción de colesterol de la dieta en el intestino, hasta la eliminación de colesterol en la bilis bajo la forma de ácidos biliares, lipoproteínas, vitamina D y hormonas esteroideas.

Se han propuesto 2 modelos diferentes para explicar el eflujo del colesterol desde el interior celular hacia la superficie. El primero de ellos se explica por exocitosis, donde el colesterol

libre, derivado de la hidrólisis de ésteres de colesterol, se asocia con fosfolípidos, en el aparato de Golgi, y se generan vesículas que llegan a la membrana plasmática en el dominio donde se ubica ABCA1 (estructura con forma de U). El segundo de los mecanismos se explica por retroendocitosis, donde la ApoAI interacciona con ABCA1 ubicado en la membrana plasmática. Ambas moléculas son endocitadas residiendo bajo forma de vesículas. Los lípidos son transportados al interior de estas vesículas por medio de ABCA1 y una vez en el interior pueden interactuar con ApoAI. Luego, el complejo fosfolípido-colesterol-ApoAI se libera de la célula por exocitosis (Oram J, et al, 2005).

Esta función, de TRC, estaría evitando la formación de la placa de ateroma. La primera etapa del TRC consiste en el eflujo de colesterol de las células por la interacción con la subfracción pre- β 1 de las HDL. El complejo naciente constituido por ApoAI y pobre en lípidos, solubiliza ese dominio lipídico de la capa externa de la membrana, formando una partícula de HDL de forma discoidal (Oram et al, 2003) (Figura 4).

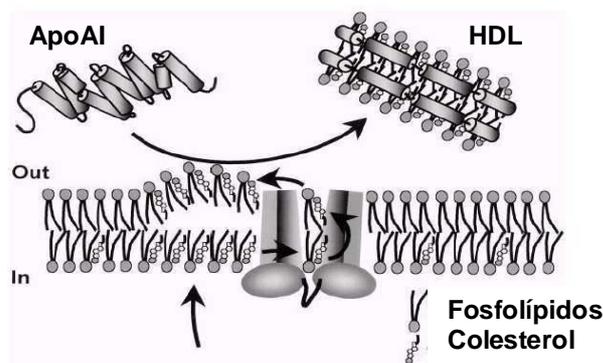


Figura 4: Interacción entre la apolipoproteína AI y el transportador de membrana ABCA1 donde ocurre la eliminación del exceso de colesterol celular.

Como se mencionó antes, en los sitios específicos de las membranas celulares de las células vasculares donde fluye el colesterol hacia las HDL, se encuentran los transportadores de membrana del tipo ABCA1. El mecanismo de transporte utiliza ATP para bombear colesterol y fosfolípidos de manera activa hacia el exterior de la célula (Brooks-Wilson A et al, 1999). Así se da el transporte de colesterol y fosfolípidos desde la capa interna de la membrana celular hacia la capa externa.

Existen otros mecanismos que resultan en una reducción significativa en la formación de la placa de ateroma (figura 5).

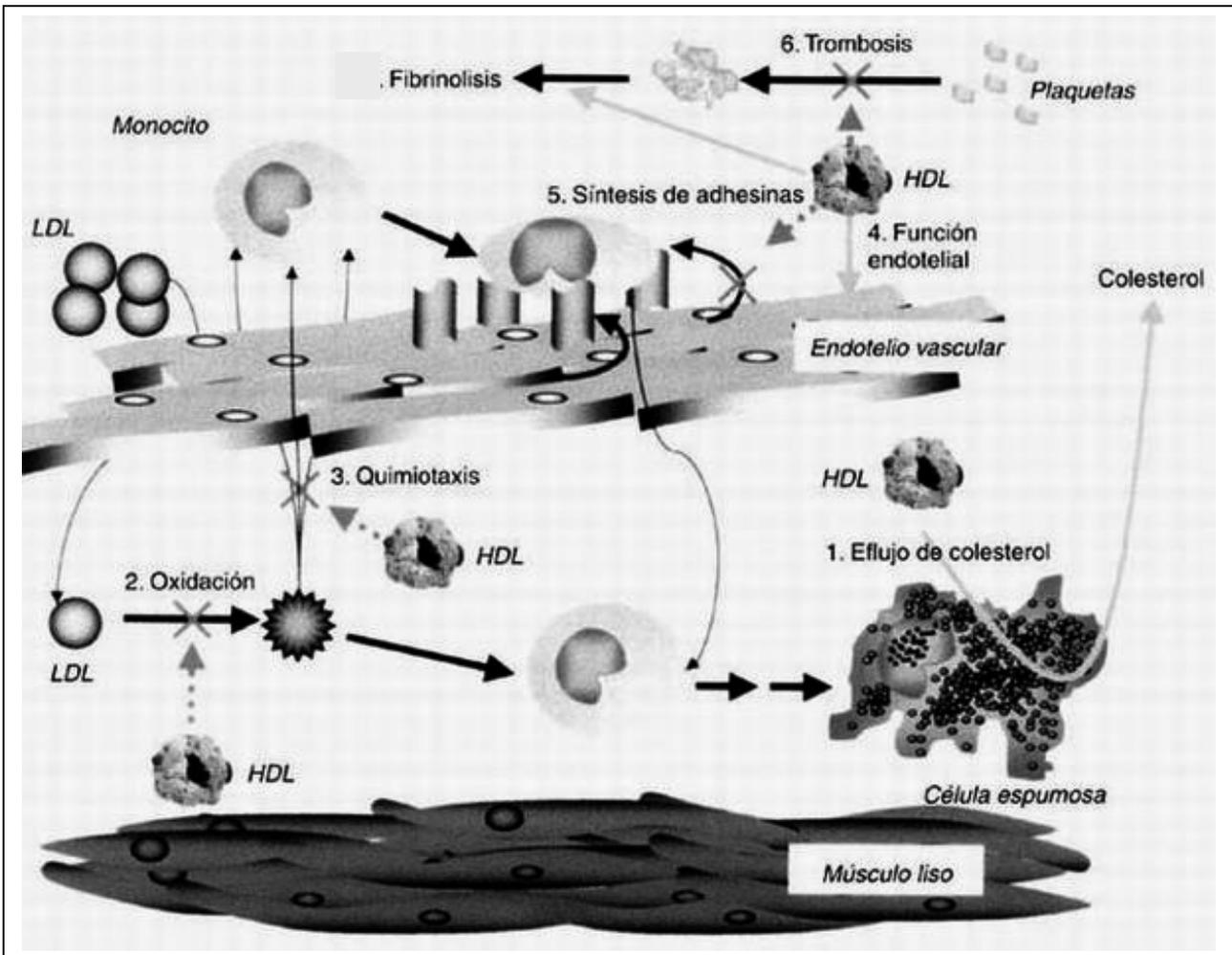


Figura 5: La figura muestra los diferentes puntos donde actúan las partículas de HDL para promover la reducción de la formación de la placa de aterosclerosis.

- Punto N°1: TRC.

- Punto N°2: Actividad antioxidante de las HDL. La habilidad de las HDL para inhibir la oxidación de las LDL se debe por un lado a una enzima antioxidante transportada por las HDL, llamada paraoxonasa y al hecho de que algunas de las lipoproteínas como la ApoAI, ApoAII y ApoAIV presentan propiedades antioxidantes intrínsecas (Aviram M et al, 1998). Además se inhibe la diferenciación de monocitos en macrófagos, que luego se convertirán en células espumosas en la íntima del vaso.

- Punto N°3: Al inhibir la oxidación de las LDL se inhibe la inducción de la expresión de MCP-1, por lo que se inhibe la expresión de las moléculas de adhesión en células endoteliales y así disminuye el reclutamiento celular. Además, se inhibe la síntesis de citoquinas, inhibiendo la quimiotaxis.

- Puntos N°4 y N°6: Protección de la función endotelial. El óxido nítrico (NO), sintetizado en respuesta a una multitud de estímulos fisiológicos, induce la relajación de los vasos sanguíneos, atenúa la adhesión de plaquetas y su agregación, inhibe la progresión de las células de músculo

liso y disminuye la adhesión y migración de leucocitos a la pared vascular. ApoAI es idéntica al factor PGI (factor estabilizador del suero) que se sintetiza en el endotelio vascular y músculo liso funcionando como vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria. ApoAI y HDL estabilizan al factor PGI con función protectora antitrombótica.

- Punto N°5: Inhibición de la expresión de moléculas de adhesión localizadas en la superficie luminal del endotelio.

Genes candidatos en las alteraciones del metabolismo de las HDL y sus variantes

Hasta el momento se ha visto que las causas genéticas de las hipoalfalipoproteinemias primarias se deben a mutaciones en tres genes diferentes: en el gen de la ApoAI, componente proteico mayoritario de las HDL, en el gen del transportador de membrana, ABCA1, involucrado en el transporte de colesterol desde las células hacia el exterior y en el gen de la LCAT, proteína esterificadora del colesterol libre de las HDL.

Gen apoAI:

El gen apoAI se encuentra en el cromosoma 11 (p11-q13), se extiende aproximadamente 2Kb y está constituido por 4 exones de 18, 63,157 y 659pb. La proteína ApoAI es el componente proteico mayor de las HDL y es cofactor de la lecitin-colesterol-acetiltransferasa.

ApoAI se sintetiza en el hígado e intestino delgado como una preproteína de 267 aminoácidos. La maduración hacia la proteína final consta de varios pasos. Primero, un péptido señal de 18aa es clivado, luego sigue una translocación en el retículo endoplásmico mientras que una presecuencia de 6aa se escinde. Finalmente, la proteína madura de 243aa es secretada. La concentración en plasma se encuentra en el rango de 1 a 1.5 mg/mL.

Variantes de la apolipoproteína A₁: Se conocen mas de setenta variantes de la molécula ApoAI. En alguno de los casos se asocian a niveles muy bajos de HDL. La más conocida es la apo-AI_{Milano} por una sustitución Arg173Cys (CGC a TGC). La presencia de la cisteína le da la capacidad a la proteína mutante de formar dímeros, los cuales tienen la capacidad de promover el flujo de colesterol de los macrófagos. Por lo tanto, a pesar de los bajos niveles de HDL, los sujetos heterocigotos parecen no tener riesgo de CHD. En otras variantes, no se ha descrito arteriosclerosis prematura a pesar de los niveles de HDL muy bajos en el plasma. Sin embargo existen otras mutaciones que causan una disminución de los niveles de HDL y de ApoAI y los individuos pueden poseer síntomas de afecciones coronarias. En este caso el tipo de herencia es dominante. En la tabla 1 se presenta un resumen de las mutaciones reportadas hasta la fecha:

Posición	Niveles de HDL/ApoAI	Característica	Ref.
A->G -75	HiperALP	Influye en los valores de HDL-C.	Pagani F, 1990
Intrón 2. Sitio de splicing G+1->C.	HALP		Yamakawa K, 1999
Gln-2->0	AALP		Ng D, 1994
Pro ₃ ->Arg		Importante para la conversión enzimática de proapoA-I hacia la forma madura Apo A-I.	von Eckardstein A, 1989

Pro ₄ ->Arg			von Eckardstein A, 1989
Gln ₅ ->Pro / codón 34->X	HALP		Nakata K, 1993
Arg ₁₀ ->Leu	HALP	Ningún efecto.	Ladías J, 1990
Gly ₂₆ ->Arg		Poli neuropatía-neuropatía amiloidea	Nichols W, 1988
Gln ₃₂ ->X	R-ApoAI+ HDL-C	Xantolema periorbital bilateral	Romling R, 1994
Trp ₅₀ ->Arg		Amiloidosis sistémica no neuropática	Booth D, 1995
Leu ₆₀ ->Arg		Amiloidosis sistémica no neuropática	Soutar A, 1992
Δ(60->71) remplazada por Val y Thr.	R-ApoAI+ HDL-C	Amiloidosis hepática y sistémica	Booth D, 1996
Gln ₈₄ ->0	R-ApoAI+ HDL-C	Aterosclerosis prematura	Matsunaga T, 1991
Leu ₉₀ ->Pro	ND	Amiloidosis cardíaca y cutánea	Hamidi Asl L, 1999
Ala ₉₅ ->Asp	N		Araki K, 1994
Tyr ₁₀₀ ->His		No aterosclerosis acelerada	Moriyama K, 1996
Lys ₁₀₇ ->X	R-HDL-C	Reduce activación de LCAT	Rall, S.,1984
Trp ₁₀₈ ->Arg	N	Sin efectos aparentes	Araki K, 1994
Glu ₁₂₀ ->Asp	R-ApoAI		Law S, 1985
Glu ₁₃₆ ->Lys	N	Una o más anormalidades lipídicas	Rall S, 1986
Glu ₁₃₆ ->X	R-HDL-C	CAD prematura	Daztani Z, 2006
Leu ₁₄₁ ->Arg	R-ApoAI	CHD	Miccoli R, 1997
Pro ₁₄₃ ->Arg	R-HDL-C	Hipertrigliceridemia. Activación defectuosa de LCAT	Utermann G, 1982 a,b
Leu ₁₄₄ ->Arg	HALP	Similar a Arg ₁₇₃ ->Cys	Recalde D, 1998
Δ(146->160)	R-ApoAI+ HDL-C	Arco senil bilateral marcado	Deeb S, 1991
Arg ₁₅₁ ->Cys	R-ApoAI+ HDL-C	Hipertrigliceridemia	Bruckert E, 1997
Val ₁₅₆ ->Glu	R-ApoAI+ HDL-C	Opacidad corneal, CAD	Huang W, 1998
Leu ₁₅₉ ->Arg	HALP	Activación reducida de LCAT	Miettinen H, 1997
Leu ₁₅₉ ->Pro	R-HDL-C	CAD prematura	Miller M, 1998
Arg ₁₆₀ ->Leu	HALP	Activación reducida de LCAT	Daum U, 1999
His ₁₆₂ ->Gln		No aterosclerosis acelerada	Moriyama K, 1996
Δ(165->175)	HALP	Activación reducida de LCAT	Campos J, 2002
Pro ₁₆₅ ->Arg	HALP	Activación reducida de LCAT	von Eckardstein, 1989
Arg ₁₇₃ ->Cys	R-HDL-C	Longevidad de TG aumentada	Weisgraber K, 1980
Arg ₁₇₃ ->Pro	R-HDL-C	Amiloidosis cardíaca y cutánea	Hamidi Asl K, 1999
Leu ₁₇₄ ->Ser	R-ApoAI+ HDL-C	Amiloidosis sistémica no neuropática	Obici L, 1999
Ala ₁₇₅ ->Pro		Amiloidosis sistémica no neuropática	Lachmann H, 2002

Leu ₁₇₈ -> Pro	HALP	Disfunción endotelial, espesor de pared arterial aumentado. CAD prematura	Hovingh G, 2004
Leu ₁₇₈ -> X	R-HDL-C	FHD, opacidad corneal, xantomas planar, y CAD prematura.	Ikewaki K, 2004
Glu ₁₉₈ ->Lys	Dislipoproteinemia	No aterosclerosis acelerada	Strobl W, 1988
Codón ₂₀₂ Frameshift	R-ApoAI	Nubosidad corneal	Funke H., 1991
Glu ₂₃₅ ->X	R- ApoAI + HDL-C	Sin efectos en VLDL, LDL y TG	Han H, 1999
Apoa1/Apoc3, Inv, Ex4/lvs1	R-HDL-C	CAD. Arco corneal, xantolemas	Karathanasis S, 1987
Δ Apoa1/Apoc3/Apoa4	Ausencia de ApoA-I		Ordovas J, 1989

Tabla 1: Mutaciones en el gen apoAI reportadas hasta el momento. En la columna 1 se indica la posición de la mutación, en la columna 2 se indica la alteración en los niveles de HDL-C o ApoAI, en la columna 3 se indica las características fenotípicas del individuo.

HiperALP: Hiperalfalipoproteinemia, HALP: Hipoalfalipoproteinemia, ND: Sin datos, R-ApoAI+ HDL-C : niveles de HDL colesterol y ApoAI reducidos, R-HDL-C: niveles de HDL colesterol, R-ApoAI: niveles de ApoAI reducidos, N: Normal, CAD: Enfermedad coronaria arterial, AALP: Analfalipoproteinemia, LCAT: lecitin colesterol acil transferasa, FHD: Deficiencia Familiar de HDL.

El análisis de la estructura secundaria de la proteína madura, permitió la identificación de repetidos de 22 aminoácidos separados por un residuo de prolina, formando α -hélices anfipáticas. Estas hélices permiten la interacción de la proteína con lípidos y con fases acuosas (McLachlan A, 1977). La prolina (Pro) presente en la primera posición de cada repetido, permite que se forme una hoja plegada β entre las hélices, por lo que es esencial en la estructura secundaria de la proteína. La presencia de un residuo de prolina parece ser necesario para definir las propiedades funcional y estructural de ApoAI. ApoAI libre de lípidos muestra un contenido de α -hélices de un 40% a un 50%, mientras que la asociación con fosfolípidos hace que el número aumenta a un 75% (el porcentaje depende del lípido que se asocie para formar el complejo). La inmunoreactividad a través de anticuerpos monoclonales cambia con la presencia de lípidos, lo que indica que existen cambios conformacionales que afectan los dominios cuando se produce esta interacción. Se pueden formar complejos tanto discoidales como esféricos, dependiendo de las condiciones de asociación (Calabresi L, 1993).

Los dominios N y C terminal de ApoAI están involucrados en la unión a lípidos, una función esencial de esta apolipoproteína, mientras que el dominio central está involucrado en la activación de LCAT. La estructura secundaria de ApoAI consiste en 10 α -hélices anfipáticas de clase A / Y que abarcan los residuos 44 al 243 y un dominio globular (residuos 1-43) que incluye 1 α -hélice anfipática que desde el residuo 8 al 33. Estudios realizados sobre un mutante de ApoAI, el cual que ha perdido los residuos 1-43, (figura 6), han sugerido que los aminoácidos deletados estabilizan la conformación de ApoAI libre de lípidos favoreciendo la formación del complejo ApoAI-lípido ya que

permite que se mantenga la accesibilidad para que se pueda dar la unión lípido-proteína (Frank P. et al, 2000).

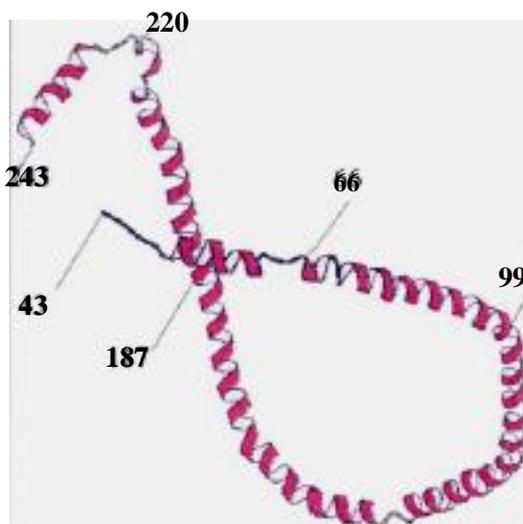


Figura 6: Representación en cinta del modelo de ApoAI al que se le ha deletado los primeros 43 aminoácidos.

La estructura cristalográfica de este mutante sugiere que cuando ApoAI se une a las HDL, se envuelve alrededor de la periferia de la partícula, perpendicular a las cadenas carbonadas de los fosfolípidos. La delección de la región codificante de los primeros 65aa mostró una disminución de la afinidad de unión a fosfolípidos respecto a la proteína silvestre, por lo que la hélice 1 (aa 44-65) parece ser importante para la asociación de ApoAI con fosfolípidos. Se han realizado estudios sobre péptidos sintéticos que corresponden a cada uno de los segmentos que forman las α -hélices de ApoAI (Palgunachari et al, 1996). Utilizando estos péptidos sintéticos se vio que sólo los que corresponden a los aminoácidos 44-65 y 220-241, son los que se asocian a lípidos con alta afinidad y así clarifican vesículas de fosfolípidos.

Se ha sugerido que la primera y la última hélice son las que podrían iniciar la unión a fosfolípidos, seguido luego de un efecto cooperativo de las demás hélices.

Muy pocas de las mutaciones en el dominio central de la proteína han sido asociadas con defectos en la unión de lípidos. En algunas mutaciones puntuales como Leu₁₄₁->Arg o delecciones como 122-165 y 144-186, se ha visto que el efecto es una disminución de la habilidad de promover el eflujo de colesterol o de inhibir la reacción de esterificación mediada por la LCAT. Se ha visto que la región 148-185 es la responsable de la unión y activación de LCAT (Sparrow J, 1980). Mediante estudios mutagénicos, Roosbeek y col. han demostrado que las argininas 149, 153 y 160 son críticas para la activación de la LCAT. Interacciones específicas entre la enzima y ApoAI induce un cambio conformacional en la proteína requerido para la actividad enzimática. Estas interacciones seguramente tienen un componente electrostático donde la actividad óptima de la enzima se da a una concentración salina de 150mM. Las argininas 149, 153 y 160 de ApoAI

formarían puentes salinos con los residuos negativos de la LCAT, o puentes de hidrógeno con otros residuos polares de la enzima. La mayoría de los puentes salinos se darían entre 2 moléculas antiparalelas de ApoAI, que formarían un dímero funcional y donde se ha visto que en la estructura del cristal de ApoAI la distribución de los puentes salinos interhélices se da de forma asimétrica. Estos datos son consistentes con el modelo de cinturón propuesto para la estructura de ApoAI. Las mutaciones en cualquiera de estas argininas no inhiben la activación de LCAT por pérdida de los puentes salinos o por disminución de las interacciones hidrofóbicas. La pérdida de activación se daría por modificación de las interacciones polares entre ambas moléculas, enzima – sustrato, Roosbeek, 2001.

El dominio C terminal de la proteína parece tener un rol importante en la interacción de del complejo proteína-lípido con la célula, cuando el complejo se presenta muy pobre en lípidos.

Genes ABC

Los genes ABC (Adenosin Trifosfato Binding Cassette), altamente conservados entre las especies, codifican una gran familia de proteínas transmembrana que se unen al ATP para dirigir el transporte de varias moléculas a través de la membrana celular. Se clasifican en transportadores ABC basándose en la secuencia y en la organización de sus dominios de unión al ATP conocidos como NBFs (nucleotide binding folds) quienes se localizan en el citoplasma y transfieren la energía para realizar el transporte. Estos transportadores se clasifican en diferentes subfamilias, basados en la similitud de la estructura del gen, el orden de los dominios y la homología de las secuencias de los dominios.

Estructura del gen y de la proteína

Una subfamilia es la ABCA que comprende 12 transportadores diferentes. Uno de ellos, ABCA1 o ABC1, está involucrado en desordenes del transporte de colesterol y en la biosíntesis de lipoproteínas de alta densidad. La proteína ABCA1, también denominada CERP (cholesterol efflux regulatory protein), es fundamental en el transporte de colesterol desde la célula hacia las partículas HDL. Contiene 2261 aminoácidos y la secuencia completa del gen se extiende 149 kb constituida por 50 exones. La estructura de la proteína está constituida por 2 mitades similares cada una de 6 dominios de α -hélices intramembrana, 3 lazos extracelulares, 2 lazos intracelulares y un dominio de unión al ATP, Dean, 2001. (Figura 7).

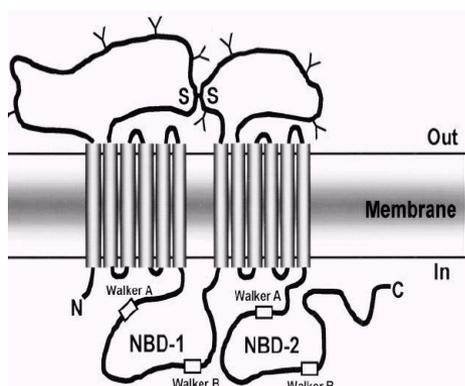


Figura 7: Modelo esquemático de la estructura de ABCA1. Se muestra un transportador completo con 12 dominios de α -hélices intramembrana, 6 lazos extracelulares donde se muestran los sitios de glicosilación, 4 lazos intracelulares y los 2 dominios de unión al ATP NBD1 y 2. Walker A y B son regiones muy conservadas.

Regulación

Como es de esperar para un transportador de membrana que media la secreción de colesterol celular que se encuentra en exceso, la transcripción del gen ABCA1 se induce por aumento en la concentración de colesterol celular.

Estabilidad proteica

- La actividad de ABCA1 de transporte de lípidos y unión a apolipoproteínas, se regula por diferentes señales que no tienen prácticamente efectos en la expresión del gen. La mayoría de estas señales son por fosforilación directa de la proteína mediadas por protein quinasas (A, C, CK2, etc.). El rápido intercambio de ABCA1 se debe a la secuencia de aminoácidos 1283 al 1306, ubicados en el primer bucle intracelular, rico en Pro-Glu-Ser-Treo (motivo PEST). La fosforilación de T1286 y T1305 en este motivo promueve la proteólisis de ABCA1 por algún miembro de la familia de las calpaínas. La interacción de apolipoproteínas con células que expresan ABCA1, reduce la tasa de degradación del transportador. Esto actúa como un mecanismo de retroalimentación para aumentar los niveles de ABCA1 cuando se está en presencia de aceptores del transporte lipídico, Yamauchi, 2003.

Las alteraciones en la estructura de ABCA1 son causa de hipoalfalipoproteinemia severa. En estos pacientes, los bajos niveles de HDL en plasma son el resultado de un eflujo deficiente de colesterol por parte de las células (Singaraja R, 2001).

Hasta el momento, al menos 70 mutaciones en ABCA1 han sido asociadas con niveles bajos de HDL. Aunque las mutaciones pueden ocurrir a lo largo de todo el gen, en ABCA1 no están distribuidas al azar. La tendencia en cuanto a la ubicación de estas mutaciones son los bucles extracelulares, los dominios NBD y la región COOH terminal. Los sectores en los que se han identificado la mayor cantidad de cambios son entre los aminoácidos: 230-282, 587-635, 990-1099, 1145-1289 y 2144-2215, figura 8.

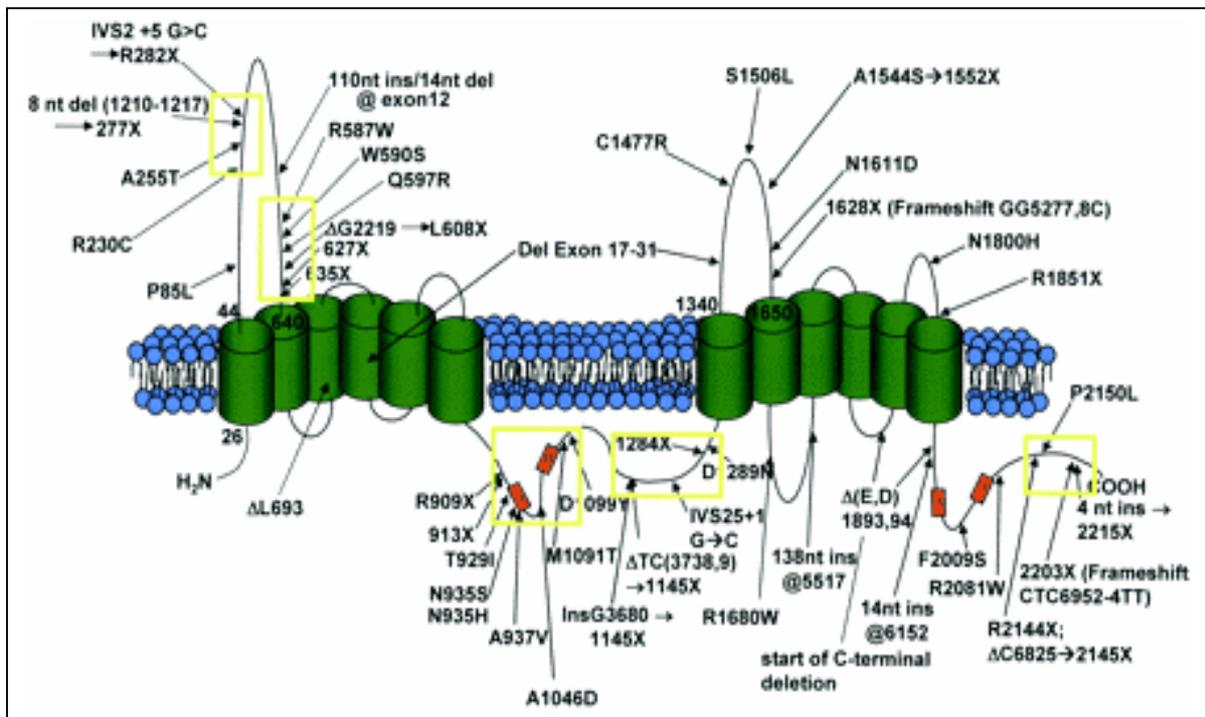


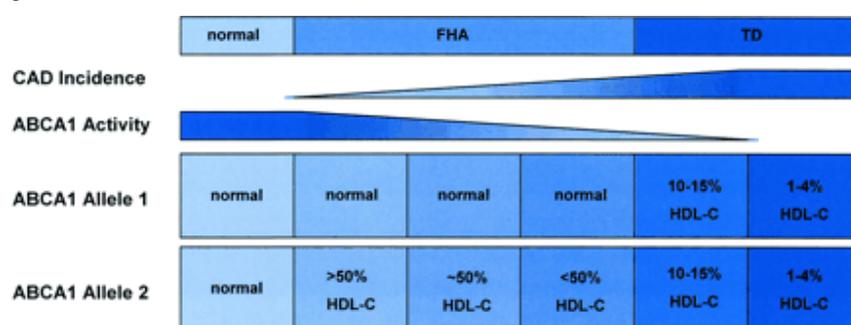
Figura 8: Modelo topológico de ABCA1 donde se indican las mutaciones descritas hasta el momento.

Algunas de esas mutaciones son causa de hipoalfalipoproteinemias manifestándose como una disminución de los niveles de HDL del plasma y enfermedad coronaria prematura. Hay pacientes que presentan defectos en la remoción de colesterol con resultados de niveles de HDL cercanos a cero y con deposiciones masivas de ésteres de colesterol en los tejidos. Un ejemplo es la Enfermedad de Tangier, (TD) también conocida como “Deficiencia de HDL tipo 1”. Esta patología fue identificada en 1960 como un síndrome de bajo HDL que afecta familias de la isla de Tangier en EE.UU. En 1999, se identificó que el gen ABCA1 era el responsable de esta afección. Se trata de una enfermedad rara, autosómica y recesiva. La enfermedad es debida a un defecto genético que afecta el metabolismo de las HDL con un catabolismo acelerado de las mismas. Los precursores de las HDL son degradados erróneamente en los lisosomas de los macrófagos causando la acumulación de ésteres de colesterol en dichas células. No se conocen casos de enfermedad de Tangier con arteriosclerosis coronaria antes de los 40 años. En algunos casos aislados de hipoalfalipoproteinemia severa, éstas no se asocian a riesgos elevados de enfermedad arterial coronaria (CAD) (Elkhalil LZ, 1997) y (Pérez-Méndez O, 1999). En ese tipo de pacientes, se ha determinado que el catabolismo de las HDL es muy elevado.

Los pacientes con las siguientes mutaciones: 635X, N935S, N1800H, 1851X, 2203X y una deleción en el extremo C terminal, poseen niveles de HDL-colesterol menores al 1% de la

población control según edad y sexo. Por el contrario, individuos con las mutaciones A255T y R1680W muestran valores de HDL mayores al 10% del de la población control según edad y sexo. En general, para los individuos que presentan mutaciones en heterocigocia, y la mutación resulta en una proteína no funcional, los valores de HDL-C esperados son aproximadamente el 50% respecto a la población control. Otra posibilidad, es que los heterocigotas muestren valores de HDL-C menores al 50% respecto a la población control. Esto es causa de un efecto dominante negativo como se ha visto en mutaciones que generan proteínas truncadas. Individuos con la mutación M1091T muestran valores de HDL del orden del 30% de la población control según edad y sexo, Singaraja, 2003.

Basados entonces en el conocimiento de las mutaciones en los individuos afectados, es posible realizar una correlación genotipo-fenotipo para las mutaciones en homocigocia o heterocigocia.



Realizando un análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de ABCA1 entre diferentes especies, se vio que el dominio N terminal es altamente conservado, mientras que los dominio central y C terminal muestran sustituciones conservadas entre las especies.

En la tabla 2 se presenta un resumen donde se incluye la mayoría de las mutaciones reportadas hasta el momento.

Posición	Fenotipo
G191C	Riesgo aumentado de CAD
C17G	Riesgo disminuído de CAD

Cambio de aminoácido	Fenotipo
Pro 25->Leu	Deficiencia de HDL
Ser 138->X	Bajo nivel de HDL
Arg 159->Lys	Altos niveles de HDL
Arg 170->Cys	Hipoalfalipoproteinemia
Ala 195->Thr	Deficiencia de HDL
Arg 222->X	Enfermedad de Tangier
Val 339->Ala	Enfermedad de Tangier
Arg 436->Trp	Altos niveles de HDL
Tyr 513->X	Enfermedad de Tangier
Arg 527->Trp	Enfermedad de Tangier
Trp 530->Ser	Enfermedad de Tangier
Trp 530->Leu	Deficiencia de HDL

Gln 537->Arg	Enfermedad de Tangier
Tyr 567->X	Enfermedad de Tangier
Arg 578->Gln	Bajo nivel de HDL
Val 711->Met	Aumento de HDL colesterol
Glu 755->Gly	Bajo nivel de HDL
Val 765->Ile	Altos niveles de HDL
Ile 823->Met	Altos niveles de HDL
Arg 849->X	Deficiencia de HDL
Thr 869->Ile	Enfermedad de Tangier
Asn 875->Ser	Enfermedad de Tangier
Asn 875->His	Enfermedad de Tangier
Ala 877->Val	Enfermedad de Tangier
Ala 986->Asp	Enfermedad de Tangier
Met 1031->Thr	Deficiencia de HDL
Asp 1039->Tyr	Deficiencia de HDL
Glu 1112->Asp	CAD prematura
Ser 1121->Phe	Bajo nivel de HDL
Asp 1229->Asn	Enfermedad de Tangier
Arg 1281->Thr	Bajo nivel de HDL
Leu 1319->Phe	Deficiencia de HDL
Cys 1417->Arg	Enfermedad de Tangier
Ser 1446->Leu	Deficiencia de HDL
Arg 1527->Lys	Alteración del nivel de HDL
Asn 1551->Asp	Deficiencia de HDL
Arg 1555->Gln	Bajo nivel de HDL
Ala 1610->Thr	Bajo nivel de HDL
Arg 1620->Gln	Aumento de HDL
Arg 1620->Trp	Enfermedad de Tangier
Val 1644->Asp	Deficiencia de HDL
Asn 1740->His	Enfermedad de Tangier
Arg 1791->X	Deficiencia de HDL
Arg 1791->Gln	Deficiencia de HDL
Phe 1949->Ser	Deficiencia de HDL
Arg 2021->Trp	Enfermedad de Tangier
Arg 2084->X	Deficiencia de HDL
Pro 2090->Leu	Hipoalfalipoproteinemia

Tabla 2: Mutaciones en el gen ABCA1 reportados en la base de datos The Human Gene Mutation Database (ref. 66)

Gen LCAT

El gen LCAT se extiende 4.2Kb y se localiza en el cromosoma 16 en la región q21-22. Está constituido por 6 exones y se expresa predominantemente en el hígado. La proteína está constituida por 440aa, 416aa la proteína madura y un péptido líder de 24aa. La enzima LCAT es responsable de la síntesis de ésteres de colesterol en plasma teniendo un rol fundamental en la maduración de las HDL y en el transporte reverso de colesterol, Argyropoulos, 1998.

Aunque LCAT puede unirse directamente los lípidos, la reacción óptima requiere de la activación mediada por la unión de la ApoA1. La reacción requiere de al menos 3 pasos: primero la LCAT se une a su sustrato (HDL), en un segundo paso se une al activador e hidroliza el ácido

graso, por último se da la reacción de trans esterificación del colesterol y su concomitante liberación.

La composición lipídica de las HDL puede afectar la habilidad de ApoAI de activar la esterificación del colesterol mediada por LCAT. Se relaciona directamente con la estabilidad y/o conformación de ApoAI o con la habilidad de LCAT de unirse a su sustrato. La reactividad está asociada con los cambios en la accesibilidad a los dominios N-terminal y central de ApoAI, que deben estar en contacto en la estructura terciaria. Como se mencionó antes, el dominio 148-185 se puede unir y producir la activación de la enzima. El mecanismo por el cual ApoAI activa LCAT involucra la interacción directa entre las α -hélices de ApoAI y los residuos 152-169 de LCAT. Los residuos cargados positivamente, presentes en las α -hélices 144-165 y 166-186 de ApoAI, podrían interactuar con los residuos de la hélice de LCAT. Se ha visto que los residuos Glu 154 y 155, y 165 de LCAT no son importantes para su activación pero están involucrados en la unión del colesterol (Wang J, 1998). La región 151-174 de LCAT puede interactuar directamente con ApoAI a través de la unión con HDL-C.

Dependiendo de la actividad medida y la masa de LCAT, la concentración de HDL y las características clínicas, las mutaciones en este gen causan 2 síndromes que se pueden clasificar como deficiencia familiar de LCAT (FLD) y enfermedad de ojo de pez (FED). En la patología FLD hay ausencia de LCAT o se produce una pérdida completa de la actividad catalítica, en FED, se pierde la actividad catalítica de los lípidos unidos a las HDL, pero esterifica el colesterol unido a lipoproteínas que contienen apoB. En ambas patologías se produce una disminución importante de la concentración de las HDL.

Análisis mutacionales de las histidinas más conservadas han identificado que el cambio de la histidina en la posición 377 anula la actividad de la enzima. Además, mutaciones en el segmento aminoacídico 154-171 de LCAT se han asociado con una disminución de la interacción con lípidos debido a una disminución de la hidrofobicidad de la cara hidrofóbica de la hélice anfipática de la molécula. Se ha sugerido que los residuos 211 al 314 están involucrados en el reconocimiento del sustrato, Frank P, 2000.

En la tabla 3 se muestra una relación genotipo-fenotipo causada por mutaciones en LCAT.

Cambio de aminoácido Fenotipo

Asn 5->Ile	Deficiencia de LCAT
Pro 10->Gln	FED
Pro 10->Leu	Deficiencia de LCAT
Thr 13->Met	Deficiencia de LCAT
Gly 30->Ser	Deficiencia de LCAT
Gly 33->Arg	Deficiencia de LCAT
Tyr 83->X	Deficiencia de LCAT
Ala 93->Thr	Deficiencia de LCAT
Arg 99->Cys	FED
Thr 123->Ile	Deficiencia de LCAT
Asn ->131Asp	Deficiencia de LCAT
Arg 135->Gln	FED

Arg 135->Trp	Deficiencia de LCAT
Arg 140->His	Deficiencia de LCAT
Arg 140->Cys	Deficiencia de LCAT
Ala 141->Gly	Deficiencia de LCAT
Pro 143->Leu	Dislipemia
Tyr 144->Cys	FED
Arg 147->Trp	Deficiencia de LCAT
Tyr 156->Asn	Deficiencia de LCAT
Arg 158->Cys	Deficiencia de LCAT
Ile 178->Thr	Bajos niveles de HDL->C
Leu 209->Pro	Deficiencia de LCAT
Asn 228->Lys	Deficiencia de LCAT
Gly 230->Arg	Deficiencia de LCAT
Pro 250->Arg	Deficiencia de LCAT
Met 252->Lys	Deficiencia de LCAT
Thr 274->Ala	Deficiencia de LCAT
Met 293->Ile	Deficiencia de LCAT
Pro 307->Ser	Deficiencia de LCAT
Thr 321->Met	Deficiencia de LCAT
Gly 344->Ser	Deficiencia de LCAT
Thr 347->Met	Deficiencia de LCAT
Phe 382->Val	Deficiencia de LCAT
Arg 399->Cys	Deficiencia de LCAT

Tabla 3: Mutaciones en el gen LCAT reportados en la base de datos The Human Gene Mutation Database (ref. 66).

Factores genéticos de riesgo para la enfermedad coronaria

Como la enfermedad coronaria puede deberse a muchos factores de riesgo, en este trabajo se ha incluido el estudio en otros genes de susceptibilidad de forma de complementar el estudio. En nuestro laboratorio se han desarrollado los sistemas para realizar el genotipado del gen de la Enzima Convertidora de Angiotensina, y del gen de la apolipoproteína E. El genotipado del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa se realiza mediante kit comercial.

La Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) juega un papel importante en la regulación de la presión arterial y el balance electrolítico, hidrolizando la angiotensina I en la angiotensina II, un potente vasopresor. El gen se encuentra en el cromosoma 17 en la región q23.2. La variación de la concentración plasmática interindividual, está determinada hasta en un 50% por una inserción (I) deleción (D) que genera un polimorfismo en el intrón 16 del gene. Los portadores del alelo D presentan un aumento de la actividad ECA-plasmática y el genotipo de D/D se ha asociado con el aumento del riesgo de infarto del miocardio y otras manifestaciones de daño vascular arteriosclerótico y de disfunción endotelial, así como con el daño renal en HTA y diabetes. (Zorilla, 2006).

El gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (5,10-MTHFR), se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 en la región p36.3. La enzima cataliza la reducción del 5,10-metileno

tetrahidrofolato (THF) a 5-metil THF, la forma primaria de folato sérico co-sustrato para la remetilación de homocisteína a metionina. El polimorfismo más estudiado, el C677T, da origen a una forma termolábil de la enzima con una reducción de su actividad en el orden del 70%. Esto genera una deficiencia relativa del proceso de remetilación de la homocisteína y un aumento de la homocisteína plasmática total, frente a la deficiencia de folato, cofactor de la enzima. La hiperhomocisteinemia es un reconocido factor de riesgo cardiovascular independiente y se asocia con riesgo aumentado de trombosis venosa y arterial (especialmente stroke). Elevados niveles de homocisteína en plasma pueden ser el resultado de un cambio genético o estar relacionado con algún disturbio alimentario. (Frosst, 1995).

El gen de la Apolipoproteína E (ApoE) se encuentra en el cromosoma 19 en la región q13.2 y se organiza en 4 exones. Codifica una proteína de 299 aminoácidos. La ApoE es uno de los principales componentes de las lipoproteínas plasmáticas con variadas acciones biológicas. Las tres isoformas proteicas mayores apoE2, apoE3 y apoE4 son productos alélicos del mismo locus y son los más comunes en la población. De estas variantes, apoE3 es la más frecuente de todas las poblaciones estudiadas. Los polimorfismos tienen efectos funcionales en el metabolismo de las lipoproteínas. El alelo E4 se asocia con alteraciones del perfil lipídico y un aumento significativo del riesgo cardiovascular, independientemente de sus efectos sobre los niveles de lípidos plasmáticos. Las isoformas difieren en los aminoácidos en las posiciones 112 y 158. ApoE3 contiene cisteína en la posición 112 y arginina en la posición 158, ApoE2 tiene cisteína en ambas posiciones mientras ApoE4 presenta arginina en ambas. (Stephens, 2001.)

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es elaborar una metodología que contribuya al conocimiento de los componentes genéticos de la hipoalfalipoproteinemia primaria. Esta patología está relacionada con trastornos en el metabolismo lipídico y se caracteriza por manifestarse como una disminución en la concentración plasmática de las HDL por debajo del percentil 10 con un componente genético.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES:

- ◆ Población: Se trabajó con una población seleccionada de 25 individuos provenientes de la Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular, que presentan valores de HDL-colesterol inferiores al percentil 10 (40mg/dL). Esta población fue referida de la policlínica de Cardiología del Hospital de Clínicas y de otros centros de salud privados. Se realizó un análisis de la historia clínica de cada paciente para corroborar que la causa del bajo HDL-C no fuese debida a otra razón, por ejemplo asociada a síndrome metabólico. Se sabe que la resistencia a la insulina puede ser el mecanismo común que conduce a otras alteraciones que involucran factores de riesgo cardiovascular, como son las alteraciones en el metabolismo lipídico (aumento de triglicéridos, disminución de HDL) y la hipertensión arterial.
- ◆ Juego de oligonucleótidos: Diseñados según las secuencias genómicas que se encuentran publicadas en las diferentes bases de datos. Los primers fueron diseñados utilizando el programa Gene Runner.

Juego de primers para amplificar en el gen apoA1:

PROMOTOR Y EXON 1

ApoA P1F 5´- GGGATGAGTGCAGGGAAC- 3´

ApoA P1Rok 5´- GCCTGAACCTTGAGCTGG- 3´

EXON 2

ApoA 2F 5´- GTACCTGAGGTCTTCTCC- 3´

ApoA 2Rok 5´- TGTGGGCTGAGATCTGAG- 3´

EXON 3

ApoA 3F 5´- AGGCAGCAGGTTTCTCAC- 3´

ApoA 3Rok 5´- CTGGCTTCAACATCATCC- 3´

EXON 4

APOA F 5´-TTCTGTCTCACCTCCAG-3´

APOA R 5´-TTTATTCTGAGCACCGGG-3´

APOA FINT 5´- CACGAGCTGCAAGAGAAG-3´

APOA RINT 5´- CACTGGGTGTTGAGCTTC-3´

Juego de primers para amplificar en el gen ABCA1:

EXON 23

23 F: 5´- CCAGTGCTTACCCCTGCTAA-3´

23 R: 5´- AACAGAGCAGGGAGATGGTG-3´

EXON 49

F 49: 5'-GGGTTCCCAGGGTTCAGTAT-3'

R 49: 5'-GATCAGGAATTCAAGCACCAA-3'

Juego de primers para amplificar en el gen LCAT

EXON 1

CAT1F: 5' CAC TGG CCA GGC CGT CCC TC -3'

CAT1R: 5' GGG GCT TAT GCA GGG CAG AAG -3'

EXON 6

CAT6F: 5' CTT GCT CCA TAT CCA CAG -3'

CAT6R: 5' CAG GGC TTA CGG TAG CAA -3'

Juego de primers para amplificar en el gen ECA

Rev: 5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT -3'

For: 5' GATGTGGCCATCACATTGGTCAGAT -3'

Juego de primers para amplificar en el gen ApoE

La secuencia de los oligos fue obtenida de Zivelin et al, 1997.

Rev: 5' -TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA -3'

For: 5' -GCCCGGCCTGGTACTGCCA -3'

Amplificación en el gen MTHFR

Se realiza mediante un kit comercial, ATGen.

MÉTODOS:

Extracción de ADN

El ADN genómico se obtuvo de leucocitos a partir de 6mL de sangre periférica utilizando un kit de extracción de ADN (ADNfácil, ATGen). El método se basa en la lisis celular con detergente, eliminación de proteínas con cloroformo y posterior precipitación con etanol.

Cuantificación de la concentración de las soluciones de ADN

Las concentraciones de soluciones de ADN se realiza por mediciones espectrofotométricas de DO a 260nm, teniendo en cuenta que: 1 DO equivale a 50 µg/mL de ADN. La concentración del ADN obtenido es estimada en muchos casos por la intensidad de la fluorescencia en geles de agarosa con bromuro de etidio (BrEt), método utilizado además para verificar la calidad del ADN.

Amplificación de ADN por la técnica de PCR.

Con el ADN obtenido de cada paciente se realizan las amplificaciones en las siguientes condiciones: ADN 20-50ng, MgCl₂ 1.5mM, Tampón 1X, primers directo y reverso 50 pmoles cada uno, mezcla de dNTPs 0.2mM c/u, enzima Taq polimerasa 0.025U/ μL.

Para realizar las distintas amplificaciones se utiliza el siguiente programa:

La mezcla se somete a una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos y luego

35 ciclos que consisten en: 94°C -30 seg
 X°C -1 min (*)
 72°C -30 seg.

Finalmente se realiza 1 ciclo final de extensión a 72°C durante 5min.

(*) La temperatura de apareamiento varía según la composición de los primers utilizados.

Primers	TM(°C)	Fragmento amplificado(pb)
ApoA P1F-ApoA P1Rok	58	356
ApoA 2F ApoA 2Rok	56	337
ApoA 3F ApoA 3Rok	54	335
ApoA1 F -ApoA1R	52	662
ApoA1Fint- ApoA1Rint	53	329
F23 - R23	57	446
F49 -R49	54	436
CAT1F-CAT1R	56	357
CAT6F-CAT6R	47	610

Análisis de los productos de PCR en geles de agarosa

Los diferentes fragmentos de ADN obtenido de las distintas amplificaciones por PCR, fueron analizados en geles de agarosa de 15x8 cm; 0.8 % para los fragmentos grandes (mayores a 500pb) y 2% para los fragmentos chicos (menores a 500pb). Se trabajó con buffer TBE 0.5X con 0,5 μg/mL de BrEt. La migración se realizó a 25mA durante 30 minutos.

Composición del TBE 5X: 89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA.

El buffer de carga utilizado consistió en: 50% Glicerol, 0.2 M EDTA pH 8.3; Azul de Bromofenol 0.05%. La visualización del ADN se realiza utilizando un transiluminador de luz U.V.

Purificación de fragmentos de ADN amplificados

Se realizó utilizando el kit comercial CLEANaprepII DNA isolation kit, ICN Biomedicals. Se basa en la propiedad del ADN doble cadena a unirse a la fibra de vidrio en presencia de altas concentraciones de GuSCN, NaClO₄ y NaI. Luego de realizar las 3 etapas de lavado para eluir

restos de proteínas, RNA y otros contaminantes, finalmente se eluye con agua o Tris-EDTA por centrifugación. Posteriormente se analiza en un gel de poliacrilamida.

Análisis en geles de poliacrilamida

El análisis de los productos amplificados y posteriormente purificados, se realiza en geles de poliacrilamida. De esta manera se constata la presencia del fragmento deseado y se verifica su tamaño. La migración se realiza a 120V, durante 1 hora.

Composición del gel: Acrilamida 29.2%/Bisacrilamida 0.8% (en TBE 0.5X)

0.8% Persulfato de amonio 10% en agua

0.08% TEMED

Composición del tampón de corrida: TBE 0.5X

La presencia de las bandas se ponen en evidencia mediante la tinción del gel con nitrato de plata. Una vez finalizada la migración, se coloca el gel durante 5 minutos en una solución fijadora (sol. 1), luego se coloca 8 minutos en la solución de nitrato de plata (sol. 2), se lava con agua destilada el menor tiempo posible (10 segundos) y luego se lo coloca en la solución reveladora (sol.3) hasta la aparición de las bandas. El posterior secado del gel se realiza colocando el mismo entre 2 hojas de papel celofán.

Composición de las soluciones de tinción:

Solución 1: 0.5% ácido acético glacial

10% etanol 95%

Solución 2: 0.2% nitrato de plata en agua

Solución 3: hidróxido de sodio 0.75M

formaldehído 0.66%

Determinación de los pesos moleculares de los fragmentos

El peso molecular se determina por comparación con diluciones de los siguientes marcadores moleculares: 100bp DNA ladder (GibcoBRL); 25pb DNA ladder (GibcoBRL) en geles de poliacrilamida.

Secuenciación de los fragmentos

Los fragmentos obtenidos son secuenciados en un secuenciador automático, servicio contratado.

Análisis de las secuencias

El alineamiento y comparación de las secuencias de los pacientes con las secuencias obtenidas de diferentes bases de datos se realizan utilizando los programas Chromas y Gene Runner.

Análisis de genotipos

El análisis del genotipo del gen de ApoE, así como la detección de la mutación C677T en el gen MTHFR y la detección de la inserción/delección en el gen de la ECA, se llevaron a cabo con los sistemas de genotipado descritos anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La importancia de este trabajo radicó en la búsqueda de mutaciones en genes candidatos responsables de las hipoalfalipoproteinemias primarias. Los genes estudiados fueron: el gen de la apolipoproteína AI, componente proteico mayoritario de las HDL, el gen del transportador de membrana ABCA1, involucrado en el transporte reverso de colesterol desde las células de tejidos periféricos hacia el hígado y el gen de la LCAT, proteína esterificadora del colesterol libre de las HDL.

La estrategia para este estudio consistió en realizar la amplificación por PCR de las diferentes regiones y un análisis posterior de la secuencia de los fragmentos. Se diseñaron cebadores específicos tomando como referencia las secuencias genómicas publicadas en la base de datos del Instituto Sanger (ref. 31). Esta base, de acceso gratuito, consta de un software que produce y mantiene la anotación automática de genomas eucariotas seleccionados. Esta anotación de más de 18.000 transcritos completos ha sido posible gracias a una combinación entre los equipos de Ensembl y los de La Habana. La característica de cada juego de primers se analizó con el programa Gene Runner. En cada uno de los sistemas debieron ser optimizadas las concentraciones de ADN, cloruro de magnesio, primers, unidades de enzima, además de la temperatura de apareamiento ADN-cebador y tiempos de extensión.

Luego de cada amplificación, el fragmento puro se envió a secuenciar. Una parte de las secuencias se realizaron en el Instituto Pasteur mientras que para otras se utilizó el servicio de Macrogen (Korea). Para el análisis de las secuencias se utilizaron los programas Chromas Lite versión 2.01 y Gene Runner versión 3.05. El primero se utiliza para visualizar los cromatogramas de las secuencias, editarlas, copiarlas y exportarlas en formato de texto. El segundo nos permite desplegar una secuencia de ADN con su complementaria, encontrar determinados motivos dentro de esa secuencia, observar el corte por diferentes enzimas de restricción, realizar la comparación entre la secuencia del paciente y la secuencia obtenida de la base de datos, diseñar juegos de cebadores, etc.

Se trabajó con una población seleccionada de 25 individuos provenientes de la Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular, que presentaron valores de HDL-colesterol inferiores al percentil 10. Como los valores bajos de HDL pueden ser debido a distintas causas, se realizó un análisis de la historia clínica de cada paciente para descartar que esos valores fueran debido a un síndrome metabólico y se seleccionaron aquellos pacientes donde el bajo HDL pareció tener un origen genético. Esto hizo que el número de pacientes fuese solamente de 25. Para aumentar esta población, se trató de conseguir la cooperación de otros centros asistenciales, pero el resultado fue prácticamente nulo.

Así, luego de realizar la selección de la población, se procedió al estudio genético de la misma.

Análisis del gen apoAI

A continuación se presenta un resumen de los cambios encontrados al secuenciar todo el gen. De izquierda a derecha se indica: el nombre del gen analizado, la ubicación dentro del gen, el cambio nucleotídico encontrado y el número de pacientes que presentan el cambio. El número total de pacientes analizados fue de 25.

GEN	Ubicación	Cambio	Nº Pacientes con cambios
ApoAI	promotor	polimorf. A-75G	7
	exón 1	S/C	
	intrón 1	S/C	
	exón 2	S/C	
	intrón 2	polimorf. T785C	18
	exón 3	S/C	
	intrón 3	S/C	
	exón 4	mutación G2006C	2
	intrón 4	S/C	

S/C: sin cambios. La numeración para localizar la posición de los cambios en la secuencia de nucleótidos se realiza tomando como referencia la secuencia publicada según Shoulders et al, 1983.

Análisis de los cambios encontrados:

- En el promotor se encontró, en 7 de los 25 pacientes analizados, el polimorfismo *MspI* previamente descrito A-75G (figura 9).

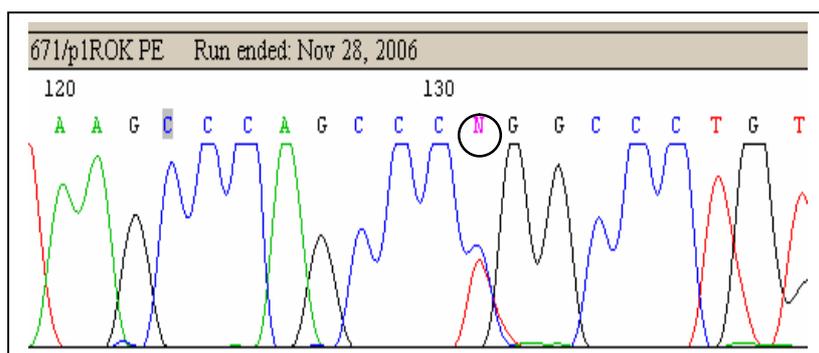


Figura 9: Parte de la secuencia de la región promotora del gen apoAI donde se muestra el cambio nucleotídico.

Esta transición ha sido estudiada extensamente. El alelo A se ha asociado, en algunos estudios, con concentraciones más altas de ApoA1 y HDL-C frente a los individuos con el alelo G. Otros estudios han encontrado resultados que están parcialmente de acuerdo o que son totalmente opuestos a estos. Un meta análisis que incluye alguno de estos resultados, ha demostrado que el alelo A podría estar asociado con un pequeño aumento (aprox. 0.05 g/L) de ApoA1 (Ordovas, 2002). La inconsistencia entre los resultados obtenidos, podría ser el resultado de las interacciones con factores ambientales que modulan el efecto de este polimorfismo. En estudios realizados, en donde se interviene sobre la dieta de los pacientes, se ha visto que el alelo A está asociado con el aumento de LDL-C en respuesta a cambios realizados en una dieta lipídica. En hombres y en mujeres luego una dieta rica en ácidos grasos poli insaturados (PUFAs), se vió que el efecto hipercolesterolémico, fue mayor en mujeres con genotipo G/A que en mujeres con genotipo G/G. Sin embargo, en los hombres el alelo A no es un predictor a esta respuesta. Una posible explicación para la asociación del alelo A con altos niveles de HDL y apoA-I en mujeres pero no en hombres podría ser que el sitio polimórfico está ubicado en una región del promotor que regula la expresión del gen en respuesta a una estimulación hormonal (Pagani et al, 1990).

En otros estudios, hombres con una dieta baja en lípidos, seguida de una dieta rica en ácidos grasos mono insaturados, demostró que los niveles de LDL-C aumentan si tienen genotipo G/A en lugar que G/G. Lo que es concordante entre estos estudios, es que los individuos portadores del alelo A responden más a los cambios dietarios que los portadores del genotipo G/G. Esto ha llevado a establecer que los ácidos grasos de la dieta, especialmente los PUFAs, pueden modular la expresión génica. Un estudio realizado por Ordovas et al, 2002, mostró cómo la dieta lipídica modula la asociación entre el polimorfismo G-75A y la concentración de HDL-C. Se observó que los individuos portadores del alelo A, frente a un consumo de PUFAs, presentan mayor concentración de HDL-C.

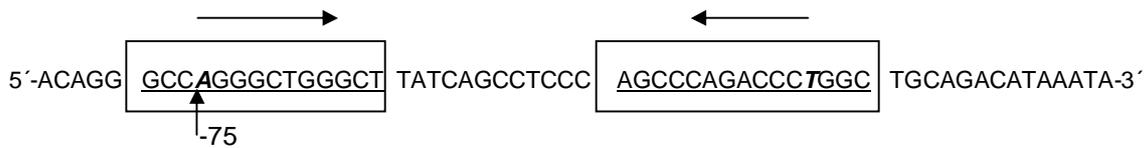
El polimorfismo -75G/A se ubica en una región rica en GC. Estas regiones son sitios blanco de metilación, por lo que la presencia de una A o una G puede influir en la eficiencia de la transcripción del gen. No se han identificado proteínas de unión al ADN en ese sitio específico en ensayos realizados con el alelo G, pero sí se ha identificado un elemento de respuesta a fármacos localizado muy cerca de ese sitio. (Ordovas, 2002).

La secuencia desde el nucleótido -380 al -410 es la siguiente:

5´- CAGCAA-CAGGGC-CGGGGC-TGGGCTTATCAG-3´

La presencia de una A crea un repetido de 6pb (CAGGGC) que podría permitir la formación de una estructura secundaria en el ADN, y esto podría estar interfiriendo de alguna manera en la unión de las proteínas del aparato transcripcional.

La región del ADN que rodea el polimorfismo es un fragmento de 51 pb rico en GC y contiene un repetido invertido compuesto por 2 elementos de 14 y 15bp.



La homología y la autocomplementaridad del repetido invertido se desorganiza cuando una G está presente en lugar de una A en la posición -75. Se ha visto que ambos elementos, el directo y el invertido, están involucrados en la regulación de la expresión génica (McKnight et al, 1982). Las mutaciones puntuales dentro de estos elementos, ya sea de origen natural, como ocurre en el gene de la beta globina humana (Orkin, et al 1982), o producida por mutaciones in vitro, como en los genes de la beta globina en el ratón (Myers et al, 1986), reducen la actividad transcripcional. Una mutación que altera la última A de la secuencia: 5'-AGGGCCA- 3' en el gene de beta globina del ratón produce una reducción drástica de la tasa de transcripción. Este motivo es idéntico al del promotor de apoA1 y esa base es justamente donde ocurre la transición A>G en la posición -75 (Myers et al, 1986).

- En las regiones intrónicas 1 y 3, y exones 1, 2 y 3 no se ha encontrado ningún cambio en la secuencia nucleotídica.
- En el intrón 2 se ha encontrado el polimorfismo T785C no descrito aún en la literatura. De los 25 individuos analizados, 11 de ellos son heterocigotas T/C (fig. 10), mientras que 7 individuos son homocigotas C/C. Un primer análisis de la secuencia muestra que este cambio no involucra ningún sitio de splicing por lo que en principio no estaría afectando la maduración del transcripto.



Figura 10: Alineamiento entre la secuencia tomada de la base de datos (apo1ex2) y la secuencia de uno de los pacientes que presenta el polimorfismo (apo2-42). En la fila superior (101) se muestra resaltada la base donde no hay coincidencia entre ambas secuencias.

- El resultado más importante ha sido el hallazgo de una mutación que consiste en el cambio G2006C en el exón 4 en 2 pacientes de una misma familia. Esta mutación implica un cambio del codón 153 CGC por CCC lo que lleva a un cambio de aminoácidos (Arg->Pro). Esta nueva mutación, que se ha denominado ApoA1Montevideo, no se encuentra descrita aún en ninguna base de datos.

La familia analizada consta de una paciente de 60 años (PG) que presenta una cardiopatía coronaria con una severa deficiencia de HDL-C (4 a 6mg/dl). Su hijo de 30años (PS), presenta

valores de HDL-C de 8 a 14 mg/dL. Esta familia presenta un comportamiento sano con un adecuado control alimentario y médico. No se registra sedentarismo, tabaquismo ni obesidad.

Los datos bioquímicos de estos 2 pacientes, obtenidos por la clínica del Dr. Alallón, son los siguientes: PG

Apolipoproteína A1: 26 mg/ dL (VR: 104-225)
 Apolipoproteína B: 73 mg/dL (VR: 60-117)
 Cociente apoB/ apoA1: 2,8 (VR: 0,7)

PS

Apolipoproteína A1: 17 mg/ dL (VR: 104-225)
 Apolipoproteína B: 132mg/dL (VR: 60-117)
 Cociente apoB/ apoA1: 7,8 (VR: 0,7)

Luego de la extracción de ADN, amplificación por PCR de la región específica (exón 4), y purificación del fragmento, éste se envía al secuenciador automático (Fig. 11).

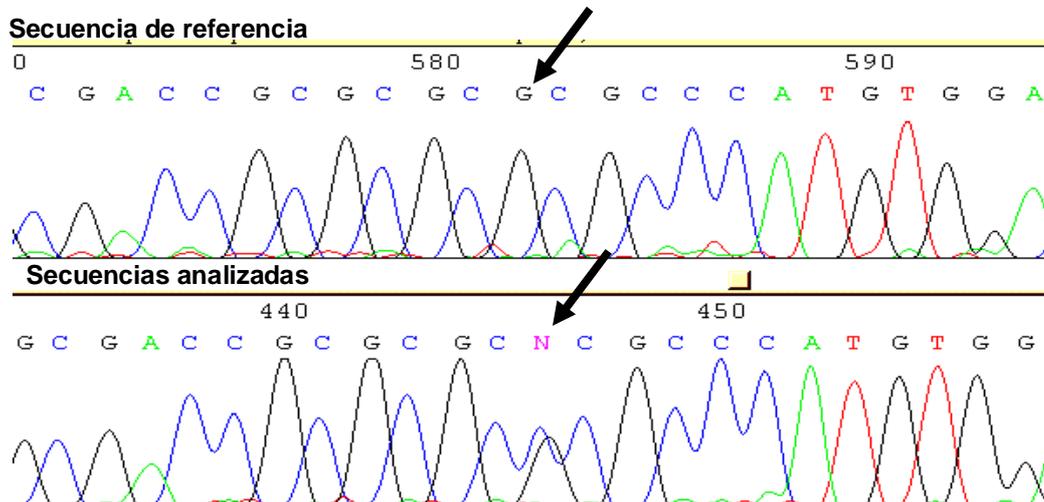
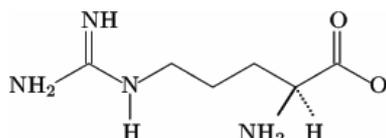


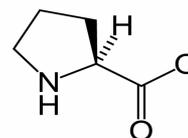
Figura 11: Secuencia del exón 4 de la ApoA1 donde se indica el cambio nucleotídico.

Como se mencionó antes, esta mutación, que consiste en un cambio G2006C en el exón 4 de la apolipoproteína A1, implica un cambio del codón 153 que codifica para arginina (CGC) al codón CCC que codifica para prolina (Arg₁₅₃>Pro). La arginina es un aminoácido cargado positivamente, mientras que la prolina (no cargado) presenta una amina secundaria (imina) que se mantiene en una conformación rígida y eso produce una reducción en la flexibilidad estructural de una proteína en ese punto.

Arginina:



Prolina:



La posición se localiza en el dominio central, que comprende los aminoácidos 144 al 186, dominio de suma importancia ya que está involucrado en la reacción de activación de LCAT. Generalmente las argininas son los residuos que evolutivamente más se conservan. La sustitución de una arginina por una prolina en la α -hélice de ese dominio central, estaría alterando la carga electrostática y la flexibilidad de la estructura, por lo que podría estar afectando la interacción con la enzima y no se daría de manera adecuada la reacción de esterificación.

Se realizó un análisis de la consecuencia de la mutación utilizando el programa PolyPhen (ref. N° 64). PolyPhen es una herramienta automática para la predicción de los posibles efectos de una sustitución de aminoácidos en la estructura y función de una proteína humana. Esta predicción se basa en reglas empíricas sencillas que se aplican a la secuencia, a la filogenética y a la información estructural, y así con estos elementos se caracteriza la sustitución. El resultado fue que “la variante predice ser probablemente dañina”.

A continuación se muestra la secuencia de la proteína donde se indica mediante un círculo el aminoácido cambiado.

```

1  AGAGACTGCGAGAAGGAGGTCCCCACGGCCCTTCAGGATGAAAAGCTGCGGTGCTGACCT
   .....-M-K-A-A-V-L-T-
61  TGGCCGTGCTCTTCTCTGACGGGGAGCCAGGCTCGGCATTCTGGCAGCAAGATGAAACCCC
   8 L-A-V-L-F-L-T-G-S-Q-A-R-H-F-W-Q-Q-D-E-P-
121  CCCAGAGCCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGCTCAAAG
   28 P-Q-S-P-W-D-R-V-K-D-L-A-T-V-Y-V-D-V-L-K-
181  ACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCAGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAAACAGCTAAACC
   48 D-S-G-R-D-Y-V-S-Q-F-E-G-S-A-L-G-K-Q-L-N-
241  TAAAGCTCCTTGACAACTGGGACAGCGTGAACCTCCACCTTCAGCAAGCTGCGCGAACAGC
   68 L-K-L-L-D-N-W-D-S-V-T-S-T-F-S-K-L-R-E-Q-
301  TCGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCTGGAAAAGGAGACAGAGGGCCTGAGCC
   88 L-G-P-V-T-Q-E-F-W-D-N-L-E-K-E-T-E-G-L-R-
361  YAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGACGACT
   108 Q-E-M-S-K-D-L-E-E-V-K-A-K-V-Q-P-Y-L-D-D-
421  TCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAGCCGCTGCGCG
   128 F-Q-K-K-K-W-Q-E-E-M-E-L-Y-R-Q-K-V-E-P-L-R-
481  CAGAGCTCCAAGAGGGCGCGGCCAGAAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAAGCTGAGCCAC
   148 A-E-L-Q-E-G-A-R-Q-K-L-H-E-L-Q-E-K-L-S-P-
541  TGGCGGAGGAGATGCGCGACCGCGCCGCCATGTGGACGCGCTGCGCACGCATCTGG
   168 L-G-E-E-M-R-D-R-A-R-A-H-V-D-A-L-R-T-H-L-
601  CCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCTCTCAAGGAGA
   188 A-F-Y-S-D-E-L-R-Q-R-L-A-A-R-L-E-A-I-K-E-
661  ACGGCGGCCAGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATGTGAGCACGCTCA
   208 N-G-G-A-R-L-A-E-Y-H-A-K-A-T-E-H-L-S-T-L-
721  GCGAGAAGGCCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAAGGCCTGCTGCCCGTGTGGAGA
   228 S-E-K-A-K-P-A-L-E-D-L-R-Q-G-L-L-P-V-L-E-
781  GCTTCAAGGTCACTTCTCTGACGCTCTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTCAACCCAGT
   248 S-F-K-V-S-F-L-S-A-L-E-E-Y-T-K-K-L-N-T-Q-
841  GAGGCGCCCGCGCCGCCCCCTTCCCGGTGCTCAGAATAAAGCTTTCCAAAGTGG
   .....Y

```

Este hallazgo nos ha permitido publicar el artículo que sigue a continuación.

Análisis de los exones 23 y 49 del gen ABCA1:

La secuencia completa del gene ABCA1 se extiende 149 kb, y está constituida por 50 exones. El hecho de que el gene sea de ese tamaño hace prácticamente imposible, desde el punto de vista económico poder realizar un análisis completo del mismo para cada paciente. Basándonos en la bibliografía, se eligieron los exones 23 y 49 para comenzar con el análisis ya que en esos exones es donde se han reportado el mayor número de cambios.

A continuación se presenta un resumen de los cambios encontrados al secuenciar los exones 23 y 49 del gen.

GENE	Ubicación	Cambio	Nº Pacientes con cambios/Nº pacientes analizados
ABCA1	exón 23	S/C	0/25
	exón 49	S/C	0/25
	intrón 49	polim. C6640G	8/25

S/C: sin cambios.

La numeración para localizar la posición de los cambios en la secuencia de nucleótidos se realiza tomando como referencia la secuencia del transcripto.

Análisis de los cambios encontrados

- En los exones 23 y 49 no se registró ningún cambio en las secuencias analizadas.
- En el intrón 49 se halló el polimorfismo C6640G en 8 de los 25 pacientes analizados (Fig 12). Al obtener este resultado, se pensó que este polimorfismo podría correlacionarse con valores bajos de HDL-C. Para ello se extendió el análisis a 8 individuos con valores normales de HDL-C. De estos 8 individuos, 3 presentaron el polimorfismo. Los resultados mostraron que las frecuencias de dicho polimorfismo son similares en ambas poblaciones, 0.32 y 0.37 para las poblaciones de bajo HDL-C y HDL-C normal, respectivamente. Por lo tanto este cambio nucleotídico no estaría relacionado con esta patología.

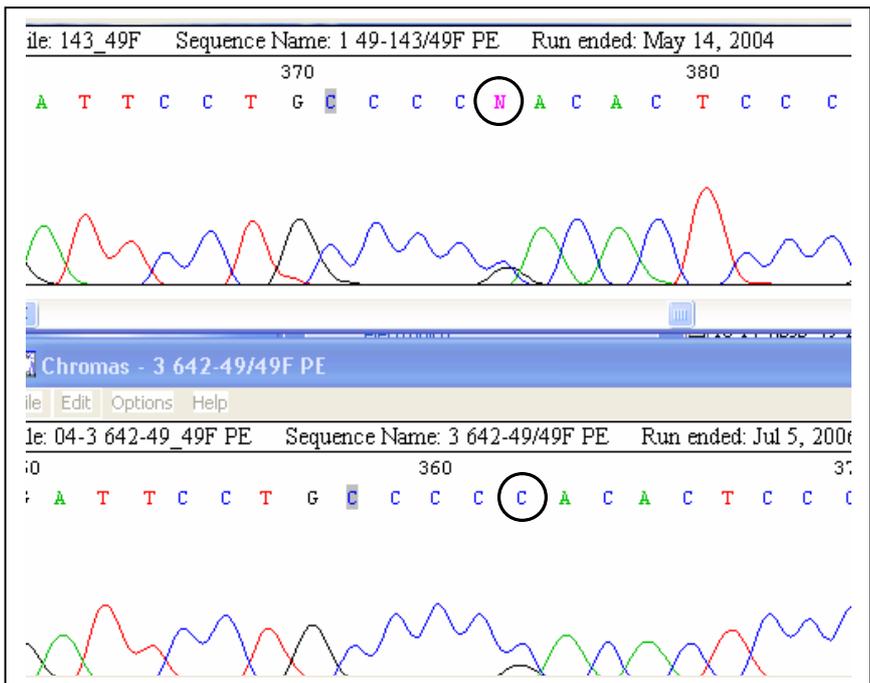


Figura 12: En la parte superior de la figura se muestra la secuencia que presenta el polimorfismo. En la parte inferior se muestra la secuencia normal.

Análisis de los exones 1 y 6 del gen LCAT:

En el exón 1 no se registró ningún cambio en las 25 secuencias analizadas.

En el exón 6, en 6 de los 25 pacientes, se encontró el polimorfismo C4886T que corresponde a una mutación silenciosa en el codón 369 que involucra una leucina (CTG->TTG) (Fig. 13).

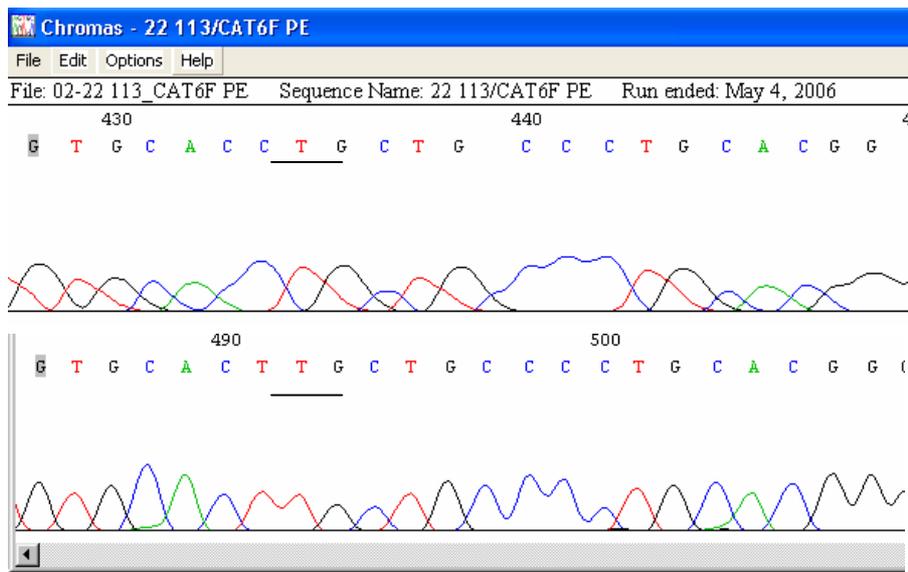


Figura 13: Región de la secuencia del exón 6 de LCAT donde se muestra el cambio de codón CTG->TTG.

Se sabe que en genes de eucariotas y procariotas la selección de codones sinónimos no se da de manera aleatoria. La mayoría de los genes en un organismo muestran un sesgo hacia seleccionar las mismas opciones de codones sinónimos existiendo una correlación positiva entre el uso de codones de los genes altamente expresados. El uso desigual de codones en las regiones codificantes, parece ser una característica universal en los genomas. Esta tendencia obedece principalmente tanto al uso desigual de los aminoácidos en las proteínas existentes, así como al uso desigual de codones sinónimos. La tendencia en el uso del codones sinónimos tiene correlación con la abundancia del correspondiente ARN de transferencia. Se ha encontrado evidencia experimental que sugiere que la velocidad de traducción entre genes es variable y se propuso que la elongación durante la traducción es el factor limitante en la tasa de traducción, argumentando que el grado en que el ribosoma hace más lento su movimiento es proporcional al inverso de la concentración de los ARNt. (Varenne, et al. 1984).

Existen varios ejemplos donde se hace evidente la influencia de mutaciones silenciosas en la expresión de un gen. Uno de ellos se observa en el gen CYP2D6 que codifica una enzima que actúa en el metabolismo de varios fármacos (beta-bloqueantes, antidepresivos, antiarrítmicos, etc). Estudios de expresión llevados a cabo en células Huh7, han demostrado que la presencia de la mutación silenciosa 2939G>A en el exón 6 (variante 2D6*59) produce una reducción 3:1 en los niveles de ARNm. Esta disminución hace que se vea alterada la función de la proteína apareciendo un fenotipo de oxidación disminuido (Toscano et al, 2006).

Una situación de similares características ocurre en el receptor de dopamina D2 (DRD2), donde se ha visto que la mutación silenciosa 957T en este gene afecta la estabilidad de los ARNm y la síntesis del receptor se ve disminuída. La mayoría de los elementos que regulan la estabilidad de los ARNm se encuentran localizados en los extremos 5' y 3' UTRs de los mismos. Sin embargo, esta mutación que afecta la estabilidad del ARNm se localiza en la región codificante. Los mecanismos por los cuales las mutaciones en regiones codificantes influyen en la estabilidad son complejos. Se postula que una de las causas podría deberse a que el cambio afecta la estructura secundaria de la molécula. (Duan J, 2003).

En el transportador de membrana ABCB1 (multidrug resistance 1 polypeptide, MDR1), también se ha visto que el nivel de ARNm se ve disminuido a causa de una mutación sinónima. Este transportador regula el eflujo de algunas drogas y xenobióticos. Dentro de los muchos polimorfismos presentes en el gene, el cambio sinónimo 3435C > T, se ha asociado con una disminución en los niveles del ARNm y proteína.(Wang D, 2005).

Una tabla de preferencia del uso de codones en el genoma humano, publicada por el Weizmann Institute of Science, muestra los siguientes resultados de uso de codones para el aminoácido leucina:

Codón	Frecuencia relativa respecto a codones sinónimos
CUG	0.43
CUC	0.20
CUU	0.12
UUG	0.12
CUA	0.07
UUA	0.06

Utilizando el programa Codon Usage Database se logró determinar la frecuencia de uso de los diferentes codones para aminoácido leucina en el gene de la LCAT. Los resultados que obtuvimos son los siguientes:

Codón	Frecuencia relativa respecto a codones sinónimos
CUG	0.55
CUC	0.30
CUU	0.05
CUA	0.05
UUG	0.04
UUA	0.00

Como se observa, el codón UUG presenta una frecuencia de uso relativa mucho menor que el codón CUG. Si bien el cambio nucleotídico C4886T no implica un cambio de aminoácido, el hecho de utilizar un codón diferente podría influir en la vida media del ARN mensajero así como en velocidad de traducción. Sin embargo, este polimorfismo descrito por Recalde y col. 1999, demostró lo contrario. Utilizando la técnica de RFLP, realizaron un estudio de 91 pacientes con hipoalfalipoproteinemia y de 100 individuos seleccionados al azar. En los pacientes afectados la frecuencia alélica fue la siguiente: 12/170 T/C, mientras que en los 100 pacientes control, la frecuencia alélica fue 14/186 T/C. Como se observa en este estudio, no se encontró una asociación significativa entre el polimorfismo y el bajo HDL-C.

Análisis de los alelos de riesgo de ApoE, ECA y MTHFR

Se realizó el genotipado de los genes ApoE, ECA y MTHFR para determinar el número de alelos de riesgo presentes en cada paciente y para estudiar la posibilidad de un sesgo de determinado genotipo hacia la población con bajo HDL.

A continuación se muestran los cálculos de las frecuencias genotípicas para el total de la población (25 pacientes), y luego se hace un análisis por separado entre los individuos con los valores más bajos de HDL y con los que poseen valores mayores de HDL.

Tomando el total de la población de 25 individuos:

ApoE: (N=25)	Frecuencia
E2/E3: 4	0.16
E3/E3: 12	0.48
E3/E4: 9	0.36
ACE: (N=25)	
ID: 9	0.36
II: 7	0.28
DD: 9	0.36
MTHFR: (N=22)	
CT: 12	0.54
CC: 8	0.36
TT: 2	0.1

Tomando la población con más bajo HDL (<30mg/dL)

ApoE: (N=10)	Frecuencia
E2/E3: 0	0
E3/E3: 7	0.7
E3/E4: 3	0.3
ACE: (N=10)	
ID: 4	0.4
II: 2	0.2
DD: 4	0.4
MTHFR: (N=10)	
CT: 7	0.7
CC: 3	0.3
TT: 0	0

Si se toma la población con mayores valores de HDL (30-40mg/dL)

ApoE: (N=15)	Frecuencia
E2/E3: 4	0.26
E3/E3: 5	0.33
E3/E4: 6	0.40
ACE: (N=15)	
ID: 5	0.33
II: 5	0.33
DD: 5	0.33
MTHFR: (N=12)	
CT: 5	0.42
CC: 5	0.42
TT: 2	0.16

La siguiente tabla presenta una comparación de las frecuencias genotípicas de estos tres genes para 2 poblaciones contrastantes en valores de HDL-Colesterol:

ApoE	Población Total HDL<40mg/dL	HDL <30mg/dL	HDL 30-40mg/dL	Población HDL >40mg/dL
E2/E3	0.16	0	0.26	0.09
E3/E3	0.48	0.7	0.33	0.58
E3/E4	0.36	0.3	0.40	0.30
ECA				
ID	0.36	0.4	0.33	0.49
II	0.28	0.2	0.33	0.23
DD	0.36	0.4	0.33	0.28
MTHFR				
CT	0.54	0.7	0.42	0.49
CC	0.36	0.3	0.42	0.35
TT	0.1	0	0.16	0.15

El análisis de estos resultados se realiza con las frecuencias obtenidas de la población total (HDL<40mg/dL) para tener un número mayor de individuos.

Respecto a la apolipoproteína E, se vio un aumento en la frecuencia de los genotipos E2/E3 (0.16 vs 0.09) y E3/E4 (0.36 vs 0.3) comparado con la población con valores de HDL>40mg/dL, y una disminución de la frecuencia del genotipo E3/E3 (0.58 vs 0.48).

Para los alelos del gen ECA se observa un pequeño aumento de la frecuencia de los genotipos DD (0.36 vs 0.28) e II (0.28 vs 0.23), y una disminución de la frecuencia del heterocigota (0.49 vs 0.36).

Para la MTHFR los valores no difieren demasiado entre ambas poblaciones. No es válido realizar un test estadístico para estudiar si los genotipos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg debido al bajo número de pacientes.

TABLA DE RESULTADOS: resumen de todos los cambios encontrados. (S/C: sin cambios)

N° paciente	Edad / sexo	HDL (mg/dL)	apoAI Prom, exón 1 e intrón 1	Exón 2 e intrón 2	Exon 3 e intrón 3	Exón 4 e intrón 4	ABCA Exón 23	ABCA Exón e intrón 49	LCAT Exón 1	LCAT Exón 6	ApoE	ACE	MTHFR C667T	N° alelos de riesgo
1	58/F	6	S/C	Polim. T785C	S/C	G2006C R153P	S/C	S/C	S/C	S/C	E3/E3	ID	CT	2
2	30/M	7,5	S/C	Polim. T785C	S/C	G2006C R153P	S/C	S/C	S/C	S/C	E3/E3	II	CC	0
3	55/M	32	Polim. A -75 G	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E3/E3	DD	CT	3
4	28/M	19	S/C	Polim. T785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	Polim. C4886T L369L	E3/E3	II	CT	1
5	33/M	23	Polim. A -75 G	Polim. T785C	S/C	S/C	S/C	Polim. C6640G	S/C	S/C	E3/E3	ID	CT	2
6	85/M	6	Polim. A -75 G	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E4/E3	ID	CC	2
7	24/F	25	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	Polim. C6640G	S/C	Polim. C4886T L369L	E3/E3	ID	CT	2
8	58/M	28	Polim. A -75 G	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E3/E3	DD	CC	2
9	47/M	22	S/C	Homo C785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E4/E3	DD	CT	4
10	19/F	29	S/C	Polim. T785C	S/C	S/C	S/C	Polim. C6640G	S/C	Polim. C4886T L369L	E4/E3	DD	CC	3
11	11/F	29-36	S/C	Polimorf. T785C	S/C	S/C	S/C	Polim. C6640G	S/C	S/C	E3/E3	II	CT	1
12	49/M	9	S/C	Polimorf. T785C	S/C	S/C	S/C	Polim. C6640G	S/C	S/C	E4/E3	DD	CC	3
13	30/F	31	Polim. A -75 G	S/C	S/C	S/C	S/C	Polim. C6640G	S/C	S/C	E4/E3	ID	CC	2
14	74/F	34	S/C	Polimorf. T785C	S/C	S/C	S/C	Polim. C6640G	S/C	S/C	E4/E3	ID	CT	3
15	24/M	34-55	S/C	Polimorf. T785C	S/C	S/C	S/C	Polim. C6640G	S/C	S/C	E2/E3	ID	CT	3
16	60/M	33	S/C	Homocig C785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E2/E3	II		1
17	48/M	33-38	S/C	Polimorf. T785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E2/E3	II	CT	2
18	59/F	38-62	Polim. A -75 G	Homocig C785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E2/E3	ID	CC	2
19	10/F	23-68	S/C	Polimorf. T785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E3/E3	ID		1
20	43/M	35	Polim. A -75 G	Homocig C785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E3/E3	DD		2
21	13/M	30-62	S/C	Polimorf. T785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E3/E3	DD	CT	3
22	38/F	37	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	Polim. C4886T L369L	E3/E3	DD	TT	4
23	34/M	25-50	S/C	Homocig C785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	E4/E3	DD	CC	3
24	50/F	34	S/C	Homocig C785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	Polim. C4886T L369L	E4/E3	II	TT	3
25	58/M	37	S/C	Homocig C785C	S/C	S/C	S/C	S/C	S/C	Polim. C4886T L369L	E4/E3	II	CC	1

En la columna "N° de alelos de riesgo" se suma el número de cada uno de ellos: alelos E4 y E2 para ApoE, alelo D para ECA y alelo T para MTHFR.

Se ha visto de la adición de factores de riesgo cardiovascular se asocia a un aumento del riesgo de eventos cardiovasculares (Baena et al, 2002). El paciente N° 2 no presenta ninguno de los alelos de riesgo para los genes ApoE, MTHFR y ACE, pero presenta la mutación R153P. En este paciente, esta mutación, es la variante genética que estaría explicando el fenotipo observado de muy bajos valores de HDL-C. La paciente N° 1, madre del anterior, presenta 2 alelos de riesgo y la misma mutación que su hijo, por lo que su fenotipo podría llegar a ser más severo. Los pacientes 9 y 22 son los que poseen mayor cantidad de alelos (4), los pacientes 3, 10, 12, 14, 15, 21, 23 y 24 poseen 3 alelos de riesgo, los pacientes 1, 5, 6, 7, 8, 13, 17, 18 y 20 poseen 2 alelos, los pacientes 4, 11, 16, 19 y 25 poseen 1 alelo mientras que, como ya se mencionó el paciente N°2 no posee ningún alelo de riesgo.

Si a estos alelos de riesgo le sumamos el número de polimorfismos encontrados en cualquiera de los tres genes ApoA1, ABCA1 y LCAT, el resultado es el siguiente:

N° paciente	Edad / sexo	HDL (mg/dL)	ApoA1	ABCA	LCAT	ApoE	ACE	MTHFR	N° alelos de riesgo + polimorfismos
1	58/F	6	2	0	0	0	1	1	4
2	30/M	7,5	2	0	0	0	0	0	2
3	55/M	32	1	0	0	0	2	1	4
4	28/M	19	1	0	1	0	0	1	2
5	33/M	23	2	1	0	0	1	1	5
6	85/M	6	1	0	0	1	1	0	3
7	24/F	25	0	1	1	0	1	1	3
8	58/M	28	1	0	0	0	2	0	3
9	47/M	22	1	0	0	1	2	1	5
10	19/F	29	1	1	1	1	2	0	5
11	11/F	29-36	1	1	0	0	0	1	3
12	49/M	9	1	1	0	1	2	0	5
13	30/F	31	1	1	0	1	1	0	4
14	74/F	34	1	1	0	1	1	1	5
15	24/M	34-55	1	1	0	1	1	1	5
16	60/M	33	1	0	0	1	0		2
17	48/M	33-38	1	0	0	1	0	1	3
18	59/F	38-62	2	0	0	1	1	0	4
19	10/F	23-68	1	0	0	0	1		2
20	43/M	35	2	0	0	0	2		4
21	13/M	30-62	1	0	0	0	2	1	4
22	38/F	37	0	0	0	0	2	2	4
23	34/M	25-50	1	0	0	1	2	0	4
24	50/F	34	1	0	0	1	0	2	4
25	58/M	37	1	0	0	1	0	0	2

Como se observa, el análisis en conjunto de todos los polimorfismos sumado a los alelos de riesgo, no muestra una correlación con los valores de HDL-C. Analizando sus historias clínicas vimos que tampoco se correlaciona con la precocidad de aterosclerosis.

También se trató de establecer, con resultado negativo, la existencia de algún haplotipo que fuera característico de esta población. No se encontró ninguna combinación de alelos que segregaran juntos.

Por otra parte, resultó muy interesante el caso clínico del paciente N° 6. Se trata de un hombre de 85 años, con muy buen estado de salud, sin enfermedad coronaria y con valores de HDL colesterol muy bajos. El perfil lipídico realizado en 3 ocasiones fue el siguiente:

TG (mg/dL)	CT(mg/dL)	HDL-C(mg/dL)	CT/HDL-C	LDL(mg/dL)
72	130	6	21.66	109.6
95	169	No detectable	--	92
75	146	No detectable	--	90

Este comportamiento fenotípico, muy bajos valores de HDL-C y un estado de salud muy bueno, resultó muy parecido a lo que ocurre con los pacientes portadores de la variante de apoA1 Milano. Esta es una mutación presente en la apolipoproteína AI, detectada en una familia de Milán cuyos antecedentes se pudieron rastrear por varias generaciones. Los portadores de esta variante presentan gran longevidad a pesar de tener valores muy bajos de HDL-C y altos valores de triglicéridos. La mutación, ubicada en el exón 4, consiste en la sustitución en la posición 173 del aminoácido cisteína por arginina que disminuye dramáticamente los niveles de HDL-C, pero que causa una ganancia de función de la proteína mejorando sus propiedades antiaterogénicas. El fenotipo observado en este paciente nos hacía sospechar de una mutación de características similares a ApoA1Milano, en principio en el gen ApoA1, o de lo contrario en algún otro gen.

Como en este paciente no encontramos ningún cambio que pudiera explicar el fenotipo, analizamos los resultados de sus análisis clínicos.

El proteinograma E.F en suero mostró:

	g/dL	Valores normales g/dL
Proteínas Totales en suero	5.9	6-8
Albúmina en suero	2.6	3.3-5
Alfa 1 globulina	0.2	0.1-0.4
Alfa 2 globulina	0.47	0.6-1
Beta globulina	0.45	0.6-1.2
Gamma globulina	2.18	0.7-1.6

La dosificación de Inmunoglobulinas fue la siguiente:

Inmunoglobulinas	Valores mg/dL	Valores normales mg/dL
IgG	1045	672-1536
IgA	207	79-317
IgM	1515	76-285

Como se observa, este paciente presenta una **Gamapatía Monoclonal Benigna del tipo IgM**. Con este nuevo dato se hizo una nueva revisión bibliográfica y encontramos que se podía relacionar esta patología con su perfil lipídico alterado.

La gamapatía monoclonal de significado incierto (o gamapatía monoclonal de importancia no determinada) es una condición que se produce por la proliferación descontrolada de células plasmáticas monoclonales, en ausencia de enfermedad clínica evidente. Esta proliferación anormal de un sólo clon de células plasmáticas puede llevar a la síntesis de gran cantidad de una inmunoglobulina homogénea o subunidades de inmunoglobulina. Hay tres signos que definen la gamapatía monoclonal:

1. Excesiva proliferación de células B sin aparente estímulo antigénico.
2. Bandas monoclonales o de inmunoglobulinas detectadas electroforéticamente
3. Disminución de niveles de inmunoglobulinas.

Estas proteínas monoclonales también son llamadas paraproteínas o Proteína M (proteína de Mieloma). En la mayoría de los casos las proteína M son indicadoras de malignidad como es el caso de mieloma o macroglobulinemia. En la electroforesis se identifica como una banda densa y bien definida comúnmente encontrada en la zona gama, pero ocasionalmente se puede hallar en las zonas beta y alfa. En las gamapatías monoclonales una inmunoglobulina o un fragmento de la misma, puede detectarse en sangre y/u orina en forma de una banda o componente monoclonal. El hallazgo de una proteína monoclonal en suero o en la orina de un paciente no implica necesariamente la presencia de una enfermedad maligna.

La gamapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) representa la más frecuente de todas las gamapatías monoclonales detectadas en el laboratorio. La enfermedad se presenta con una prevalencia en la población general de 0,7 – 1,7 %, pero en los individuos mayores de 70 años alcanza hasta el 3% (Kyle et al, 2006).

La GMSI recibe este nombre por dos motivos:

- en la mayoría de los casos su origen es desconocido, aunque puede ser secundaria a hepatopatías víricas, enfermedades autoinmunes, polineuropatías, etc.
- su pronóstico y evolución es incierto, un porcentaje de los pacientes progresan al cabo de años hacia una enfermedad maligna tipo mieloma o linfoma.

Los criterios diagnósticos de la GMSI son: proteína monoclonal en suero <3 g/dL, células plasmáticas en médula ósea < 10%, sin evidencia de anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal o lesiones óseas. Ante un paciente al que se le detecta una banda monoclonal en suero y/o orina, se debe descartar mediante la anamnesis, exploración física y pruebas de laboratorio la presencia de anemia, dolores óseos, insuficiencia renal o hipercalcemia. Del mismo modo, debe descartarse la presencia de adenopatías o síntomas asociados a un síndrome linfoproliferativo (fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso), sobre todo en pacientes con bandas monoclonales de tipo IgM.

Ocasionalmente, la enfermedad puede evolucionar a enfermedades malignas, como el mieloma múltiple, la amiloidosis, la macroglobulinemia de Waldenstrom, y síndromes

linfoproliferativos. El diagnóstico se realiza por el hallazgo de hiperglobulinemia en el proteinograma electroforético plasmático, generalmente en las regiones beta o gamma. La cuantificación de la proteína M se realiza por densitometría, mientras que la clase de inmunoglobulina aumentada se detecta por técnicas de inmunofluorescencia. Las más frecuentes en orden decreciente son IgG > IgM > IgA. (Kyle et al, 2006).

Se ha visto que existe una deficiencia adquirida de HDL-C asociado con inmunoglobulinas monoclonales reactivas para la apolipoproteína A-I. Las inmunoglobulinas dirigidas contra los componentes proteicos de las lipoproteínas pueden causar alteración del metabolismo lipoproteico. Estos tipos de alteraciones se han descrito en pacientes con mieloma múltiple, xantomatosis, Gamapatías Benignas, artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico y síndrome antifosfolipídico primario. En la mayoría de los casos, una hiperlipidemia resulta de inmunoglobulinas reactivas contra la apolipoproteína B, presente en las VLDL y LDL. Menos comunes han sido los casos de hipolipidemia, asociado a inmunoglobulinas reactivas contra las HDL..

Se han reportado casos de pacientes que han mostrado niveles de HDL-C muy bajos, inferiores al percentil 5, asociados con una gamapatía benigna y además con la presencia de inmunoglobulinas séricas reactivas contra ApoAI. La presencia de anticuerpos (Ac) anti ApoAI está asociada con anomalías en la composición de las HDL. El suero de estos pacientes presenta una ausencia casi total de partículas de HDL2 (grandes y maduras), mientras que en el análisis lipídico se vio que las partículas de HDL son deficientes de lípidos. Los anticuerpos de este tipo podrían inducir niveles bajos de HDL-colesterol, por disminución de la capacidad de acumular lípidos por parte de las HDL nacientes, o por eliminación de los inmunocomplejos (Ac-ApoAI o Ac-HDL) por parte del sistema retículoendotelial. (Méndez et al, 2002). En estos casos, la electroforesis de lipoproteínas muestra una banda extra, lo que sugiere la presencia de complejos Ig-lipoproteínas, pero con niveles de ApoAI y apoB no detectables. Puede que existan otros mecanismos adicionales que podrían ser los responsables del bajo HDL. La inflamación aguda causa alteraciones lipoproteicas mediada por reactivos de la fase aguda y/o citoquinas. También los mediadores de la inflamación pueden influir en las concentraciones de HDL.

Hasta que no exista una mejor comprensión de los orígenes de la deficiencia de HDL adquirida, todos los resultados hasta el momento sugieren que una marcada disminución de HDL sin causa, puede indicar una gamapatía en desarrollo.

Por otra parte, se ha visto además, que la presencia de una proteína M en el suero o en la orina en concentraciones muy altas, puede causar una significativa injerencia en los ensayos de química clínica. Ejemplos de este tipo de interferencias se han visto en la determinación de distintos analitos como lo son glucosa, bilirrubina, gama-glutamilttransferasa, urea y ferritina. Alguno de los posibles mecanismos de interferencia pueden ser la producción de turbidez por parte de la proteína M, o la unión de dicha proteína tanto a un componente del sistema de determinación utilizado como al analito mismo. Existen analizadores modernos capaces de detectar cambios inusuales en la absorción en el transcurso de una reacción, y por lo tanto, la formación de turbidez

debido a la proteína M. Esta interferencia puede evitarse mediante la optimización de las condiciones de reacción para evitar la formación de turbidez o por la eliminación de la proteína M antes del análisis de la muestra. Debido a las distintas propiedades que tiene cada una de las proteínas M, es imposible realizar una protección en común frente a estas interferencias para los sistemas de detección (Bakker, 2007). Este tipo de interferencias ha hecho que en algunos laboratorios se implemente un protocolo interno, donde cada vez que llega un paciente con valores muy bajos de HDL (casi indetectables), automáticamente se le realiza una evaluación para detectar la presencia de una gamapatía monoclonal. (Baca, 2004).

De esto se deduce que debe existir un contacto más directo entre el médico y el laboratorio, sobre todo porque algunos resultados (inesperados en algunos pacientes con gamapatías monoclonales) pueden pasar inadvertidos para el laboratorio. Se ha sugerido el uso de algún tipo de distintivo adicional en la muestra que presenta una paraproteína para evitar estos falsos resultados (Berth, 2004). Existen reportes donde se observa que si una interferencia ocurre con determinada metodología, otros sistemas de detección también se verían afectados. Se ha visto además que este tipo de comportamiento no sólo se da con diferentes equipos de detección, sino además con diferentes concentraciones de muestra (Yang et al, 2008).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

El hallazgo de mutaciones relevantes en cualquiera de los 3 genes estudiados es de gran importancia para poder explicar la causa de la manifestación de esta patología en la población estudiada.

Gen apoA1:

Se ha encontrado una mutación consistente en un cambio G2006C en el exón 4 de ApoA1 que implica un cambio del codón 153 CGC por CCC (Arg->Pro). La nueva mutación ApoA1_{Montevideo}, no encontrada en ninguna base de datos, se presume como un fuerte candidato causante de una Hipoalfalipoproteinemia Familiar con características de transmisión dominante, en una familia con valores de HDL (entre 6 y 9 mg/dL) y de ApoA1 (entre 17 y 26 mg/dL) muy bajos. La mutación co-segrega con una enfermedad coronaria precoz.

El polimorfismo A-75G hallado en el promotor de ApoA1, que ha sido muy estudiado, se asocia con variaciones en el nivel de HDL, pero sobre todo se sabe que sobre este polimorfismo existen interacciones con factores ambientales que modulan su efecto.

En cuanto al polimorfismo del intrón 2, T785C, no se puede sacar ninguna conclusión hasta no culminar con su estudio. Debemos conocer con qué frecuencia aparece este polimorfismo en una población con valores normales de HDL.

Genes ABCA1 y LCAT:

Los polimorfismos encontrados en el intrón 49 del gen ABCA1 (C6640G) y en el exón 6 del gen de la LCAT (C4886T) parecen no correlacionarse con valores bajos de HDL.

Análisis de los alelos de riesgo de ApoE, ECA y MTHFR

Respecto a la apolipoproteína E, se vio un aumento en la frecuencia de los genotipos E2/E3 (0.16 vs 0.09) y E3/E4 (0.36 vs 0.3) comparado con la población con valores de HDL > 40 mg/dL, y una disminución de la frecuencia del genotipo E3/E3 (0.58 vs 0.48).

Para los alelos del gen ECA se observa un pequeño aumento de la frecuencia de los genotipos DD (0.36 vs 0.28) e II (0.28 vs 0.23), una disminución de la frecuencia del heterocigota (0.49 vs 0.36).

Para la MTHFR los valores no difieren demasiado de los valores hallados en la población normal.

El análisis en conjunto de todos los polimorfismos sumado a los alelos de riesgo, NO sirven como herramienta para buscar una posible correlación con la precocidad de aterosclerosis.

Como se vio, es importante la realización de un estudio clínico profundo en los pacientes que presentan valores de HDL-C muy bajos ya que la causa de este fenotipo podría deberse a errores en la cuantificación debido al método utilizado, podría estar asociado a una patología, y no tener una causa genética.

PERSPECTIVAS

Medir la actividad de la enzima LCAT en los 2 individuos que poseen la mutación R153P para saber si ese aminoácido es importante o no para la activación de la enzima.

Hallar con qué frecuencia aparece el polimorfismo T785C en intrón 2 del gen apoA1, en una población con valores normales de HDL.

Secuenciar los exones 2, 3, 4 y 5 del gen de la LCAT para poder completar su estudio.

Secuenciar el promotor y otros exones del gen ABCA1 que presenten altas tasas de mutación.

Desarrollar mediante biotecnología, péptidos miméticos de ApoA1 que convierten la capacidad proinflamatoria de las HDL en antiinflamatorias y reducen la aterosclerosis.

Determinar la presencia de anticuerpos anti ApoA1 en el paciente que presenta la gamapatía monoclonal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Araki K, Sasaki J, Matsunaga A et al. 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(3): 272-278.
- 2- Argyropoulos G, Jenkins A, Klein R. Transmission of two novel mutations in a pedigree with familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency: structure–function relationships and studies in a compound heterozygous proband. *The Journal of Lipid Research*, 1998: Vol. 39, 1870-1876.
- 3- Assmann G, Schulte H, Von Eckardstein A, Huang Y: High-Density Lipoprotein Cholesterol As A Predictor Of Coronary Heart Disease Risk: The PROCAM Experience And Pathophysiological Implications For Reverse Cholesterol Transport. *Atherosclerosis* 1996: 124: 11-20.
- 4- Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CI, et al. Paraoxonase Inhibits High-Density Lipoprotein Oxidation And Preserves Its Functions. A Possible Peroxidative Role For Paraoxonase. *J Clin Invest* 1998: 101: 1581-1590.
- 5- Baca A, Haber H, Sujishi K, et al. Artifactual Undetectable HDL-Cholesterol with the Beckman Synchron LX and Vitros 950 Assays Temporally Associated with a Paraprotein. *Clin Chem*. 2004;50:51.
- 6- Baena JM, ÁlvarezB y Piñol P, et al. Asociación entre la agrupación (clustering) de factores de riesgo cardiovascular y el riesgo de enfermedad cardiovascular. *Rev Esp Salud Pública* 2002: 76: 7-15
- 7- Barter P.J. Cardioprotective Effects of High-Density Lipoproteins. The Evidence Strengthens. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005;25:1305.
- 8- Baker A and Mucke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. *Clin Chem Lab Med*. 2007:45.
- 9- Berth M and Delanghe J. Protein precipitation as a possible important pitfall in the clinical chemistry analysis of blood samples containing monoclonal immunoglobulins: 2 case reports and a review of the literature. *Acta Clinica Bélgica*. 2004: 59-5
- 10- Booth, D. R.; Tan, S-Y.; Booth, S. E. et al. Hereditary hepatic and systemic amyloidosis caused by a new deletion/insertion mutation in the apolipoprotein A1 gene. *J. Clin. Invest*. 1996: 97: 2714-2721.
- 11- Booth, D., Tan S., Booth S, et al. A new apolipoprotein AI variant, Trp50Arg, causes hereditary amyloidosis. *Q. J. Med*. 1995: 88:695–702.
- 12- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee S, et al. Mutations In ABC1 In Tangier Disease And Familial High-Density Lipoprotein Deficiency. *Nat Genet* 1999: 22: 336-345.
- 13- Bruckert E, von Eckardstein A, Funke H, et al. The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoproteinA-I produces a phenotype similar to that of apolipoproteinA-I Milano. *Atherosclerosis*. 1997: 128: 121–128.
- 14- Calabresi L, Meng Q, Castro R, et al. Apolipoprotein AI conformation in discoidal particles:evidence for alternate structures. *Biochemistry*. 1993: 32: 6477-6484.

- 15- Codon Usage Database: <http://www.kazusa.or.jp/codon/countcodon.html>
- 16- Dastani Z, Dangoisse C, Boucher B, et al. A novel nonsense apolipoprotein A-I mutation (apoA-I(E136X)) causes low HDL cholesterol in French Canadians. *Atherosclerosis*. 2006; 185(1): 127-1136.
- 17- Daum U, Leren T, Langer C, et al. Multiple dysfunctions of two apolipoprotein A-I variants, apoA-I(R160L)Oslo and apoA-I(P165R), that are associated with hypoalphalipoproteinemia in heterozygous carriers. *J Lipid Res*. 1999; 40: 486–494.
- 18- Dean M, Rzhetsky A y Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2001;11(7):1156-66.
- 19- Deeb S, Cheung M, Peng R, et al. A mutation in the apolipoprotein A-I gene: dominant effect on the level and characteristics of plasma high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1991; 266: 13654–13660.
- 20- Duan J, Wainwright M, Comeron J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Gen* 2003; 12(3), 205–16.
- 21- Elkhalil L, Majd Z, Bakir R, et al. Fish-Eye Disease: Structural And In Vivo Metabolic Abnormalities Of High-Density Lipoproteins. *Metabolism* 1997; 46: 474-483.
- 22- Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.
- 23- Frank P y Marcel Y. Apolipoprotein A-I: structure;–function relationships. *Journal of Lipid Research*. 2000: Vol. 41, 853-872.
- 24- Fredenrich A, Bayer P. Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab* 2003,29,201-5.
- 25- Frosst P, Blom H, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*. 1995; 10: 111 – 113.
- 26- Funke, H.; von Eckardstein, A.; Pritchard, P. H. et al. A frameshift mutation in the human apolipoprotein A-I gene causes high density lipoprotein deficiency, partial lecithin:cholesterol-acyltransferase deficiency, and corneal opacities. *J. Clin. Invest*. 1991; 87: 371-376.
- 27- Hamidi Asl, K.; Liepnieks, J.; Nakamura, M. et al. A novel apolipoprotein A-1 variant, arg173 to pro, associated with cardiac and cutaneous amyloidosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1999; 257: 584-588.
- 28- Hamidi Asl, L.; Liepnieks, J. J.; Hamidi Asl, K. et al. Hereditary amyloid cardiomyopathy caused by a variant apolipoprotein A1. *Am. J. Path*. 1999; 154: 221-227.
- 29- Han H.; Sasaki J.; Matsunaga A. et al. A Novel Mutant, ApoA-I Nichinan (Glu235→0), Is Associated With Low HDL Cholesterol Levels and Decreased Cholesterol Efflux From Cells Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19:1447-1455.
- 30- Hovingh G, Brownlie A, Bisioendial R, et al. A novel apoA-I mutation (L178P) leads to endothelial dysfunction, increased arterial wall thickness, and premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44(7): 1429-435.

- 31- Sanger Institute web site: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html
- 32- Huang, W.; Sasaki, J.; Matsunaga, A. et al. A novel homozygous missense mutation in the Apo A-I gene with Apo A-I deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18: 389-396.
- 33- Ikewaki K, Matsunaga A, Han H, et al. A novel two nucleotide deletion in the apolipoprotein A-I gene, apoA-I Shinbashi, associated with high density lipoprotein deficiency, corneal opacities, planar xanthomas, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2004; 172(1): 39-45.
- 34- Karathanasis, S. K.; Ferris, E.; Haddad, I. A. DNA inversion within the apolipoproteins AI/CIII/AIV-encoding gene cluster of certain patients with premature atherosclerosis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1987; 84: 7198-7202.
- 35- Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med.* 2006; 354:1362-1369.
- 36- Lachmann, H. J.; Chir, B.; Booth, D. R. et al. Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis. *New Eng. J. Med.* 2002; 346: 1786-1791.
- 37- Ladas, J. A.; Kwiterovich, P. O. Jr.; Smith, H. et al. Apolipoprotein A1 Baltimore (arg(10)-to-leu), a new APOA1 variant. *Hum. Genet.* 1990; 84: 439-445.
- 38- Law S, Brewer HB Jr. Tangier disease. The complete mRNA sequence encoding for preproapo-A-I. *J Biol Chem.* 1985; 260(23): 12810-12814.
- 39- Lusis A. & Ivandic B. Principles and Practice of Medical Genetics. Lipid Metabolism. 2001 p1945-1969
- 40- Martín-Campos J., Julve J., Escolà J. Et al. ApoA-IMALLORCA impairs LCAT activation and induces dominant familial hypoalphalipoproteinemia. *J Lipid Res.* 2002; 43: 115-123.
- 41- Matsunaga, T.; Hiasa, Y.; Yanagi, H. et al. Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1991; 88: 2793-2797.
- 42- McLachlan A. Repeated helical pattern in apolipoprotein AI. *Nature.* 1977;267: 465-466.
- 43- McKnight, S. L., and R. Kingsbury. . Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science.* 1982; 217: 316-324.
- 44- Mendez A, Goldberg R, Arnold P et al. Acquired HDL Deficiency Associated With Apolipoprotein A-I Reactive Monoclonal Immunoglobulins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002; 22:1740-1741
- 45- Miccoli R, Zhu Y, Daum U, et al. A natural apolipoprotein A-I variant, apoA-I (L141R)Pisa, interferes with the formation of α -high density lipoproteins (HDL) but not with the formation of pre- β 1-HDL and influences efflux of cholesterol into plasma. *J Lipid Res.* 1997; 38: 1242–1253.
- 46- Miettinen H. E., Gylling H., Miettinen T. et al. 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.
- 47- Miller M., Aiello D., Pritchard H. et al. Apolipoprotein A-I_{Zavalla} (Leu₁₅₉→Pro) : HDL Cholesterol Deficiency in a Kindred Associated With Premature Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1242 - 1247.
- 48- Moriyama K, Sasaki J, Matsunaga A et al. Identification of two apolipoprotein variants, A-I Karatsu (Tyr 100→His) and A-I Kurume (His 162→Gln). *Clin Genet* 1996; 49: 79-84.

- 49- Moss A, Goldstein R, Marder V, et al. Thrombogenic Factors And Recurrent Coronary Events . *Circ.* 1999 99: 2517-2522.
- 50- Myers M, Tilly K, and Maniatis T. Fine structure genetic analysis of a beta globin promoter. *Science.* 1986: 232: 613-618.
- 51- Nakata, K.; Kobayashi, K.; Yanagi, H. et al. Autosomal dominant hypoalphalipoproteinemia due to a completely defective apolipoprotein A-I gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993: 196: 950-955.
- 52- Ng, D. S.; Leiter, L. A.; Vezina, C. et al. Apolipoprotein A-I Q[-2]X causing isolated apolipoprotein A-I deficiency in a family with analphalipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* 1994: 93: 223-229.
- 53- Nichols, W. C.; Dwulet, F. E.; Liepnieks, J. et al. Variant apolipoprotein AI as a major constituent of a human hereditary amyloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988: 156: 762-768.
- 54- Obici, L.; Bellotti, V.; Mangione, P. et al. The new apolipoprotein A-I variant leu174-to-ser causes hereditary cardiac amyloidosis, and the amyloid fibrils are constituted by the 93-residue N-terminal polypeptide. *Am. J. Path.* 1999: 155: 695-702.
- 55- Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 May 1;23(5):720-7.
- 56- Oram J & Heinecke W. ATP-Binding Cassette Transporter A1: A Cell Cholesterol Exporter That Protects Against Cardiovascular Disease. *Physiol. Rev.* 2005 85: 1343-1372.
- 57- Ordovas, J. M.; Cassidy, D. K.; Civeira, F. et al. Familial apolipoprotein A-I, C-III and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J. Biol. Chem.* 1989: 264: 16339-16342.
- 58- Ordovas J, Corella D, Cupples L et al. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the *APOA1* G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002: Vol. 75, No. 1, 38-46.
- 59- Orkin, S, Kazazian H, Antonarakis S, Goff S, et al. Linkage of beta-thalassemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature.* 1982: 296: 627-631.
- 60- Pagani F, Sidoli A, Giudici G, et al. Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: association with hyperalphalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 1990: 31: 1371-1377.
- 61- Palgunachari, M. N., Mishra, V. K., Lund-Katz, S, et al. Only the two end helices of eight tandem amphipathic helical domains of human apo A-I have significant lipid affinity—implications for HDL assembly. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996. 16:328-338.
- 62- Pagani F, Sidoli A, Giudici G, et al. Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: association with hyperalphalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 1990: 31: 1371-1377.
- 63- Pérez-Méndez O, Bruckert E, Franceschini G, et al. Metabolism Of Apolipoproteins Ai And Aii In Subjects Carrying Similar Apoal Mutations, Apoal Milano And Apoal Paris. *Atherosclerosis* 1999: 148: 317-325.
- 64- PolyPhen: prediction of functional effect of human nsSNPs. <http://tux.embl-heidelberg.de/ramensky/>

- 65- Rall, S., Jr.; Weisgraber, K. ; Mahley, R. et al. Abnormal lecithin:cholesterol acyltransferase activation by a human apolipoprotein A-I variant in which a single lysine residue is deleted. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 10063-10070.
- 66- Rall, S.; Weisgraber, K.; Mahley, R. et al. Identification of homozygosity for a human apolipoprotein A-I variant. *J. Lipid Res.* 1986; 27: 436-441.
- 67- Recalde D, Cenarro A, Civeira F, et al. Apo A-I Zaragoza (L144R): a novel mutation in the apolipoprotein A-I gene associated with familial hypoalphalipoproteinemia. *Hum. Mutat.* 1998; 11:416-416.
- 68- Recalde D., Cenarro A, Civeira F, et al. A novel DNA polymorphism (4886C>T) in the human LCAT gene. *Hum Mutat.* 1999. Volume 15, Issue 3Pages 298 – 298.
- 69- Romling, R.; von Eckardstein, A.; Funke, H. et al. A nonsense mutation in the apolipoprotein A-I gene is associated with high-density lipoprotein deficiency and periorbital xanthelasmas. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1994; 14: 1915-1922.
- 70- Roosbeek, S, Vanloo, B, Duverger, N, et al. Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase *J. Lipid Res.* 2001 Jan; 42(1): 31-40
- 71- Schaefer E, Lamon-Fava S, Ordovas J, et al. Factors Associated With Low And Elevated Plasma High-Density Lipoprotein Cholesterol And Apolipoprotein A-I Levels In The Framingham Offspring Study. *J Lipid Res* 1994; 35: 871-882.
- 72- Shoulders C , A R Kornbliht, B S Munro, and F E Baralle. Gene structure of human apolipoprotein A1. *Nucleic Acids Res.* 1983 May 11; 11(9): 2827–2837.
- 73- Singaraja R, Bocher V, James E, et al. Human ABCA1 Bac Transgenic Mice Show Increased HDL-C And Apoal Dependent Efflux Stimulated By An Internal Promoter Containing Lxres In Intron 1. *J Biol Chem* 2001; 276: 33969-33979.
- 74- Singaraja R; Brunham L; Visscher H et al. Efflux and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; 23:1 322.
- 75- Sparrow J, Gotto M. Phospholipid binding studies with synthetic apolipoproteins fragments. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1980. 348: 187-211.
- 76- Soutar, A. K.; Hawkins, P. N.; Vigushin, D. M. et al. Apolipoprotein AI mutation arg-60 causes autosomal dominant amyloidosis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1992:
- 77- Stephens J, Sozen M, Whittall R, et al. Three Novel Mutations in the Apolipoprotein E Gene in a Sample of Individuals with Type 2 Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry. American Association for Clinical Chemistry, Inc.* 2005; 51:119-124.
- 78- Strobl, W.; Jabs, H.-U.; Hayde, M. et al. Apolipoprotein A-I (glu198-to-lys): a mutant of the major apolipoprotein of high-density lipoproteins occurring in a family with dyslipoproteinemia. *Pediat. Res* 1988; 24: 222-228.
- 79- The Human Gene Mutation Database (HGMD) <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>:
- 80- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final Report. *Circ* 2002; 106: 3143-3421.

- 81- Tilly-Kiesi M, Zhang Q, Ehnholm S, et al. ApoA-I Helsinki (Lys107→0) associated with reduced HDL-cholesterol and LpA-I:A-II deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1294–1306.
- 82- Toscano, Claudia; Raimundo, S; Klein K, et al. A silent mutation (2939G>A, exon 6; CYP2D6*59) leading to impaired expression and function of CYP2D6. *Pharmacogenetics & Genomics.* 2006: 16(10):767-770.
- 83- Utermann, G.; Feussner, G.; Franceschini, G. et al. Genetic variants of group A apolipoproteins: rapid methods for screening and characterization without ultracentrifugation. *J. Biol. Chem.* 1982: 257: 501-507.
- 84- Utermann, G.; Steinmetz, A.; Paetzold, R. et al. Apolipoprotein AI(Marburg): studies of two kindreds with a mutant of human apolipoprotein AI. *Hum. Genet.* 1982: 61: 329-337.
- 85- Varenne, S, Buc, J, Lloubes, R, et al. Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. *J Mol Biol* 1984:180(3):549-76.
- 86- von Eckardstein, A.; Funke, H.; Henke, A. et al. Apolipoprotein A-I variants: naturally occurring substitutions of proline residues affect plasma concentration of apolipoprotein A-I. *J. Clin. Invest.* 1989: 84: 1722-1730.
- 87- Wang D, Johnson A, Papp A, et al. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C > T affects mRNA stability. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005:15:693–704.
- 88- Wang J, DeLozier A, Gebre K, et al. Role of glutamic acids residues 154, 155 and 165 of LCAT in cholesterol esterification and phospholipase A2 activities. *J Lipid Res.*1998: 39: 51-58.
- 89- Weisgraber, K.; Bersot, T.; Mahley, R. et al. A-I (Milano) apoprotein: isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *J. Clin. Invest* 1980: 66: 901-907.
- 90- Wilson P, Garrison R, Castelli W, et al. Prevalence Of Coronary Heart Disease In The Framingham Offspring Study: Role Of Lipoprotein Cholesterols. *Am J Cardiol* 1980: 46: 649-654.
- 91- Yamakawa-Kobayashi, K.; Yanagi, H.; Fukayama, H. et al. Frequent occurrence of hypoalphalipoproteinemia due to mutant apolipoprotein A-I gene in the population: a population-based survey. *Hum. Molec. Genet.* 1999: 8: 331-336.
- 92- Yamauchi Y, Hayashi M, Abe-Dohmae S, et al. Apolipoprotein A-I Activates Protein Kinase C α Signaling to Phosphorylate and Stabilize ATP Binding Cassette Transporter A1 for the High Density Lipoprotein Assembly. *J. Biol. Chem.* 2003: 278 (48): 47890-47897.
- 93- Yang Y, Howanitz P, Howanitz J, et al. Paraproteins are a common cause of interferences with automated Chemistry methods. *Arch Pathol Lab Med.* 2008: 132: 217-223.
- 94- Zivelin A, Rosenberg N, Peretz H et al. Improved method for genotyping apolipoprotein E polymorphisms by a PCR-based assay simultaneously utilizing two distinct restriction enzymes. *Clinical Chemistry.* 1997: 43: 1657-1659
- 95- Zorrilla P, Mimbacas A, Gascue C et al. Prevalencia del polimorfismo I/D del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en la población de Montevideo. *Rev Med Uruguay.* 2006: 22: 17-21