



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
CATEDRA DE PASANTIAS HOSPITALARIAS



**HIPERTRICILGLICERIDEMIA POSTPRANDIAL Y SU ASOCIACIÓN CON  
LOS POLIMORFISMOS -482C>T; -455T>C DEL GEN APOC<sub>3</sub> Y -1135 T>C  
DEL GEN APOA<sub>5</sub>**

**Autores:**

Br. Claudia Reitter

Br. Jesús Rodríguez

**Tutores :**

Dra. María Fátima Garcés

Lcdo. Yamil Guarín

**Asesor estadístico**

Msc María Luisa Nuñez

Caracas, Octubre 2017



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
CATEDRA DE PASANTIAS HOSPITALARIAS



**HIPERTRICILGLICERIDEMIA POSTPRANDIAL Y SU ASOCIACIÓN CON  
LOS POLIMORFISMOS -482C>T; -455T>C DEL GEN *APOC<sub>3</sub>* Y -1135 T>C  
DEL GEN *APOA<sub>5</sub>***

Proyecto que se entrega para optar al Título de licenciado en Bioanálisis.

**Autores:**

Br. Claudia Reitter

Br. Jesús Rodríguez

**Tutores :**

Dra. María Fátima Garcés

Lcdo. Yamil Guarín

**Asesor estadístico**

Msc María Luisa Nuñez

Caracas, Octubre 2017

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
Índice General.....	iii
Resumen.....	iv
 Capítulo (s)	
<b>Introducción</b> .....	1
 <b>I El problema de investigación</b>	
A. Planteamiento del problema .....	4
B. Justificación de la investigación .....	7
C. Objetivos .....	8
1. Objetivo general.....	8
2. Objetivos Específicos .....	8
 <b>II Marco teórico</b>	
A. Antecedentes.....	9
B. Bases teóricas .....	12
1. Triacilglicéridos (TG) .....	12
a. Metabolismo de los TG.....	12
b. Metabolismo ineficiente de los triacilglicéridos .....	13
c. Consecuencias metabólicas de la hipertriacilgliceridemia .....	16
2. Aterosclerosis.....	16
2.1 Fases de formación de la placa de ateroma.....	17
a. Acumulación y modificación de las lipoproteínas .....	18
b. Reclutamiento de leucocitos y formación de células espumosas .....	19
c. Formación del casquete fibroso.....	20
2.2 Factores de riesgo de la aterosclerosis .....	21
2.3 LDL y Aterogénesis .....	22

3. Polimosfismos de las apolipoproteina C <sub>3</sub> y A <sub>5</sub> .....	25
3.1 3.1 Apolipoproteina C <sub>3</sub> (ApoC <sub>3</sub> ) .....	25
3.2 Apolipoproteina A <sub>5</sub> (ApoA <sub>5</sub> ) .....	27

### III Marco Metodológico

A. Diseño de la Investigación .....	29
1. Tipo de Investigación .....	29
2. Población y muestra .....	29
3. Instrumento de Recolección de Datos .....	29
4. Criterios de Inclusión/ Exclusión .....	30
5. Análisis estadístico .....	30
B. Diseño de la Metodología .....	33
1. Muestras sanguíneas .....	33
2. Química sanguínea .....	33
3. Electroforesis de colesterol .....	34
C. Determinación de genotipo .....	34
1. Extracción del ADN genómico .....	35
2. Cuantificación de ADN.....	35
D .Identificación de genotipo de apoc <sub>3</sub> .....	35
1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	36
2. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) .....	38
E. Identificación de genotipo de apoa <sub>5</sub> .....	39
1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	39
2. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) .....	39

### IV Resultados

<b>A Resultados.....</b>	<b>40-59</b>
<b>B Discusión .....</b>	<b>59-68</b>
<b>C Conclusiones.....</b>	<b>68-69</b>
<b>D Recomendaciones.....</b>	<b>70</b>

<b>Referencias bibliográficas</b> .....	70
<b>Anexos</b> .....	79-80
“A” .....	80
“B” .....	49

## HIPERTRIACILGLICERIDEMIA POSTPRANDIAL Y SU ASOCIACION CON LOS POLIMORFISMOS -482C>T, -455T>C DEL GEN APOC<sub>3</sub> Y -1131T>C DEL GEN APOA<sub>5</sub> EN SUJETOS APARENTEMENTE SANOS

Autores: Reitter Claudia, Rodriguez Jesus

Tutor(a): Dr. María Fátima Garcés

Cotutor: Lcdo. Yamil Guarín

Año: 2017

### RESUMEN

**INTRODUCCION:** En Venezuela, México, Argentina y Brasil, la hipertriacilgliceridemia se ubica entre los cinco principales factores de riesgo de Enfermedad Cardiovascular (ECV). La hipertriacilgliceridemia postprandial se conoce como los niveles de TAG que después de la ingesta de un alimento con una carga lipídica establecida, se encuentren por encima de los valores de referencia establecidos, lo que lleva a desarrollar aterosclerosis aumentando el riesgo a sufrir ECV. El metabolismo lipídico está fuertemente influenciado por los polimorfismos genéticos, se propone que variaciones en la expresión de las apolipoproteínas podrían propiciar la hipertriacilgliceridemia postprandial.

**OBJETIVO:** Evaluar la posible asociación entre los polimorfismos -482C>T; -455T>C del gen *ApoC<sub>3</sub>* y -1131 T>C del gen *ApoA<sub>5</sub>* con la hipertriacilgliceridemia postprandial en sujetos aparentemente sanos.

**METODOLOGIA:** La población está constituida por 175 individuos aparentemente sanos. Se les evaluó perfil lipídico en condiciones basales, 2 y 4 horas postprandiales tras la ingestión de una carga lipídica de 26,3 gramos de grasa. El estudio genético se realizó para las variantes -482 C>T -455 T>C del gen *apoC<sub>3</sub>* y -1131 T>C del gen *apoA<sub>5</sub>* por técnicas PCR-RFLP.

**RESULTADOS:** Al evaluar la asociación entre los genotipos y las variables bioquímicas y clínicas se encontró que solo existió diferencia significativa y correlación positiva entre el peso y el genotipo TT para el polimorfismo -482 C>T ( $r=0.174$ ,  $p=0.011$ ) y el genotipo CT en la variante -455 T>C ( $r= 0.149$ ,  $p=0.024$ ). En el caso del polimorfismo -1131 T>C se encontró correlación positiva entre el genotipo CC y los niveles de TAG 2h ( $r= 0.167$ ,  $p=0.013$ ) y 4 horas ( $r= 0.20$ ,  $p=0.004$ ), insulina basal ( $r= 0.22$ ,  $p=0.002$ ) y HOMA ( $r= 0.23$ ,  $p=0.001$ ), por otra parte, empleando el modelo de herencia recesivo se encontró que los portadores del genotipo C/C presentan un OR de 14,65 (IC: 1,665 - 128,914) con un  $p=0,009$ . El haplotipo de riesgo para la hipertrigliceridemia postprandial fue TCC (-482/-455/-1131) con una frecuencia de 0,2255 en el grupo intolerante vs 0,1128 en el grupo tolerante con un  $p=0,017$ .

**CONCLUSIÓN:** Se encontró asociación entre el genotipo CC del polimorfismo -1131 del gen *apoA<sub>5</sub>* y los niveles de TAG postprandiales, además los portadores del genotipo CC presentan 14 veces más riesgo de presentar hipertriacilgliceridemia postprandial.

**PALABRAS CLAVES:** Hipertriacilgliceridemia, polimorfismo, postprandial, ApoC<sub>3</sub>, ApoA<sub>5</sub>.

## Introducción

Los Triacilglicéridos postprandiales son la concentración encontrada de triacilglicéridos en la sangre, después de la ingesta de comida. El organismo de los distintos individuos se comporta diferente ante el consumo de alimentos, en algunos los niveles de Triacilglicéridos (TAG) aumentan mucho más que en otros después de dicha ingesta. Las variaciones de las concentraciones de TAG van a depender de los tipos de comida que ingiera el individuo y de su genética que va a incidir directamente en la captación, transporte y metabolismo de los lípidos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) como trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, entre los que se incluyen las cardiopatías coronarias, las enfermedades cerebrovasculares, el aumento de la tensión arterial, las vasculopatías periféricas, las cardiopatías reumáticas, las cardiopatías congénitas y la insuficiencia cardíaca<sup>1</sup>.

Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo, afectando de igual manera a hombres como a mujeres, principalmente al 80% de los habitantes en países con ingresos bajos y medios; ya que, carecen de acceso a métodos preventivos que se implementan en los países de ingresos altos<sup>2</sup>.

En Venezuela, México, Argentina y Brasil, la hipertriacilgliceridemia (triacilglicéridos superior a 150 mg/dL en sangre) se ubica entre los cinco principales factores de riesgo de ECV, junto con la obesidad y la hipertensión (HTA)<sup>3</sup>. Recientemente se ha propuesto que los remanentes de quilomicrones (QM) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL por sus siglas en Ingles *very low density lipoprotein*) presentes en el suero postprandial (muestras obtenidas de pacientes después de ingerir alimento) podrían jugar un papel en el desarrollo de la aterosclerosis, indicando así que medir los niveles de TAG sin estar en ayunas puede ser más efectivo para evaluar estos riesgos<sup>4</sup>.

Comúnmente los TAG son medidos de forma rutinaria en ayunas debido a su metabolismo, sin embargo, a excepción de las primeras horas de la

madrugada, la mayoría de los individuos están en el estado postprandial la mayor parte del tiempo. La aterosclerosis puede ser un fenómeno postprandial en el que las lipoproteínas remanentes desempeñan un papel dominante<sup>5</sup>.

Varias investigaciones han buscado dar respuesta a la causa del aumento de los niveles de TAG en condiciones basales describiéndose:

- Hipertriacilgliceridemia aislada (fenotipos I, IV y V de Fredrickson)
- Hiperquilomicronemias primarias
  - Déficit familiar de LPL
  - Déficit familiar de apo C-II
  - Inhibidor familiar de la LPL
  - Déficit familiar de apolipoproteína A-V
- Hipertriacilgliceridemia familiar
- Hiperlipidemia familiar combinada (fenotipo variable)
- Hiperlipidemia mixta (fenotipos IIb y III de Fredrickson)
  - Hiperlipidemia familiar combinada (fenotipo variable)
  - Disbetalipoproteinemia
- Hipertrigliceridemia con cHDL bajo
  - Dislipidemia aterogénica<sup>6</sup>

Sin embargo, la asociación de los niveles de TAG que en condiciones basales son considerados normales, pero en estados postprandiales se encuentran aumentados es una novedad que se busca dilucidar.

Es necesario definir el término de hipertriacilgliceridemia postprandial, como aquellos niveles de TAG que después de la ingestión de un alimento con una carga lipídica establecida, se encuentren por encima de los valores de referencia o valores considerados normales, que han debido ser establecidos

previamente para la población a evaluar<sup>7</sup>.

La expresión del genotipo individual es clave en el metabolismo celular, y el metabolismo lipídico no se encuentra exento de las condiciones genéticas, se ha buscado asociar la hipertriacilgliceridemia con diversos polimorfismos o variantes genéticas que alteren el funcionamiento de las proteínas encargadas del correcto metabolismo lipoprotéico y es donde se proponen variaciones en los genes de la *apoC<sub>3</sub>* y *apoA<sub>5</sub>* como posibles causantes de estados de hipertriacilgliceridemias.

Dammerman y col, analizaron la secuencia del ADN del promotor *apoC<sub>3</sub>* de sujetos con hiperlipidemia tipo III y con hipertriacilgliceridemia grave revelando cinco polimorfismos distintos<sup>8</sup>.

La apolipoproteína C<sub>3</sub> (*apoc<sub>3</sub>*) modula el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos y desempeña una función de vital importancia en la función postprandial de los triacilglicéridos<sup>9</sup>. Wateworth y col. en el año 1999, encontraron que las variantes genéticas específicas en el locus del gen de *apoC<sub>3</sub>*, no solo afecta a los niveles de triacilglicéridos en sangre sino también a la glucosa postprandial en respuesta a una prueba de sobrecarga de glucosa<sup>10</sup>.

Miller y col en el año 2007, encontraron polimorfismos del gen promotor *apoC<sub>3</sub>* (-482C>T, -425T>C) asociados con el síndrome metabólico (SM)<sup>11</sup>. Estudios semejantes encontraron su asociación del mismo gen con diabetes<sup>12</sup> y resistencia a la insulina<sup>13,14</sup>.

Por su parte, con respecto al gen *apoA<sub>5</sub>* diversas variantes han sido asociadas al aumento de los niveles séricos de triacilglicéridos en diferentes poblaciones. Entre éstas, las dos más estudiadas son: -1131 T>C (región promotora) y c.56 G>C (S19W)<sup>15,16</sup>

La presencia de estos polimorfismos se ha asociado a una disminución de la expresión del gen *apoA<sub>5</sub>*, lo que condicionaría un aumento en los niveles de triacilglicéridos<sup>17,18</sup>, y a una mayor predisposición a padecer diabetes mellitus tipo 2<sup>18</sup>; ambos factores de riesgo reconocidos de enfermedad coronaria.

Es por todas estas razones que nos propusimos como objetivo de éste trabajo

determinar si el aumento de los niveles de TAG postprandiales está asociado a los polimorfismos del gen *ApoC<sub>3</sub>* y *ApoA<sub>5</sub>* y de esta manera determinar el riesgo que sufre la población aparentemente sana de padecer enfermedades cardiovasculares y metabólicas dependiendo del alelo que presenten.

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

#### Planteamiento del problema

Según la OMS las ECV son la primera causa de muerte a nivel mundial. Existen factores de riesgo que influyen en el desarrollo de las ECV, algunos de ellos son modificables como: la obesidad, el tabaquismo, el consumo excesivo de bebidas alcohólicas, el sedentarismo, la mala alimentación, las dislipidemias, el estrés; y otros son no modificables como la edad, el sexo, y los antecedentes familiares.

Son múltiples los estudios de asociación entre los niveles elevados de TAG y el aumento del riesgo cardiovascular, la interrelación entre ambos procesos se evidencia a través del mecanismo fisiopatológico conocido como aterosclerosis. La aterosclerosis es una enfermedad de progreso lento y silencioso que comienza a manifestarse clínicamente después de la tercera o cuarta década de vida cuando ocurre la obstrucción total o parcial de una arteria por un trombo, esta obstrucción impide el correcto flujo sanguíneo a un determinado tejido, si la obstrucción es sostenida en el tiempo produce isquemia que puede conllevar a necrosis, comprometiendo la correcta funcionalidad del órgano o tejido afectado, los escenarios más comunes y más graves son las complicaciones clínicas como el infarto agudo al miocardio y las ECV.

La aterosclerosis está compuesta por dos fenómenos interrelacionados, la aterosclerosis que es la acumulación focal de lípidos intracelulares y extracelulares con formación de células espumosas y reacción inflamatoria; y la esclerosis que es el endurecimiento cicatrizal de la pared arterial, caracterizado por el aumento del número de miocitos, distrofia de la matriz extracelular y más tardíamente por calcificación y mayor infiltración inflamatoria<sup>19</sup>.

Comúnmente los niveles de TAG en sangre son determinados en estado preprandial a pesar de que el periodo postprandial constituye el estado metabólico habitual en el que se encuentra el ser humano a lo largo del día, y donde se produce un estado de riesgo mayor de padecer ECV<sup>19</sup>.

En pacientes cardiopatas y con intolerancia a las grasas los niveles de TAG tienden a estar por encima del intervalo de referencia, y como son los TAG el principal detonante del proceso aterosclerótico es que se puede asociar un aumento de los niveles de TAG postprandiales con una mejor predicción de riesgo a sufrir una ECV que los medidos en estado de ayuno, ya que por ser el estado postprandial el predominante a lo largo del día el factor de riesgo es mayor, independientemente de otros factores de riesgo cardiovascular<sup>19</sup>.

Las causas de la hipertriacilgliceridemias son numerosas partiendo de alteraciones metabólicas que se manifiestan en estados preprandiales hasta otras que se manifiestan solo en estado postprandial, siendo estas las de más difícil conocimiento por la poca evaluación de los TAG en estado postprandial y además de manifestarse en individuos aparentemente normolipemicos cuando son evaluados en condiciones de ayuno prolongado

Se han descrito gran cantidad de polimorfismos en genes asociados al metabolismo lipídico que se cree alteran el comportamiento metabólico normal en los individuos que los presentan, y es por ello que de ser posible conocer y estratificar la relación existente entre las variantes genéticas y el grado de riesgo cardiovascular al que se asocian se podrían utilizar estas variantes como marcadores biológicos de riesgos cardiometabólicos.

Bajo es te mismo orden de ideas con la utilización de las variantes genéticas o polimorfismos como indicadores de riesgo a ECV se podría lograr brindar un panorama mucho más amplio para el tratamiento y control de las dislipidemias y en especial un gran aporte en la prevención de enfermedades asociadas a las alteraciones lipídicas, ya que conociendo con certeza la existencia de una predisposición genética bajo la manifestación de portador de un alelo (heterocigoto) o ambos alelos (homocigotos) se podrán manejar a diferentes escalas los factores modificables en la vida cotidiana de los individuos con el fin

de controlar el estado de riesgo, y lograr así dar respuesta a la problemática de la gran morbi-mortalidad asociada a los procesos ateroscleróticos.

Es por ello que en este trabajo se proponen a los polimorfismos  $-482C>T$  y  $-455T>C$  del gen *ApoC<sub>3</sub>* y el  $-1131 T>C$  del gen *ApoA5* por ser las apoC<sub>3</sub> y apoA<sub>5</sub>, apolipoproteínas participes importantes en el adecuado metabolismo de los TAG, como indicadores de riesgo a ECV en conjunto con los niveles de TAG postprandiales.

La apolipoproteína C<sub>3</sub> se ha postulado que puede contribuir al catabolismo disminuido de lipoproteínas ricas en Triacilglicéridos a través de un efecto inhibitorio sobre la lipoproteína lipasa por desplazamiento del activador apoC<sub>2</sub> y /o por inhibición de la captación hepática de lipoproteínas remanentes mediada por la apolipoproteína E (*apoE*)<sup>20</sup>. Polimorfismos en la región promotora del gen que codifica esta proteína podrían aumentar su síntesis por no responder a los mecanismos regulatorios de la expresión del gen, aumentando así su acción inhibitoria sobre la enzima lipoproteína lipasa lo que se traduciría en un aumento en la concentración del sustrato de la misma, o lo que es decir un estado de hipertriacilgliceridemia.

Con respecto a la apolipoproteína A<sub>5</sub> se cree que el mecanismo por el cual interviene, es mediado por un aumento de la actividad de la lipoproteínlipasa (LPL)<sup>21</sup> o mediante interacción con proteoglicanos que unen LPL en la superficie celular<sup>22</sup>, aumentando la lipólisis de las VLDL y disminuyendo así la concentración de TG en ellas.

También se ha sugerido que apoA<sub>5</sub> podría aumentar el aclaramiento de las VLDL, posiblemente asociado a una disminución de apoB y apoC<sub>3</sub>, y de esta forma disminuir los niveles postprandiales de triglicéridos<sup>23</sup>. Pero la expresión de polimorfismos de *apoA<sub>5</sub>* puede producir el efecto contrario al mencionado generando así estados de hipertriacilgliceridemia postprandial.

## JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Conociendo la relación directa entre los niveles aumentados de TAG y el crecimiento de riesgo cardiovascular se hace interesante dilucidar los posibles mecanismos que generen esta condición en individuos que en condiciones basales o en estado de ayuno se han catalogado como normolipémicos, pero que al evaluar el estado postprandial puedan encontrarse con hipertriacilgliceridemias posicionándolos en un mayor estado de riesgo a sufrir ECV a largo del día, por ser la etapa postprandial la que predomina el estado metabólico.

Las ECV cobran millones de vidas al año en alrededor del mundo manifestando una alta tasa de mortalidad en la población que las padece, es por ello que es imperativo un diagnóstico oportuno para el descarte de las ECV; es conocido que dentro de los factores que predisponen a los individuos sufrir ECV se encuentran las dislipidemias y consecuentemente la aterogénesis con asociación o no al estado genético individual, siendo así necesario evaluar la expresión genética como marcador de riesgo a sufrir ECV.

Es por ello que se propone la posible asociación entre los polimorfismos -482C>T; -455T>C del gen *apoC3* y -1131 T>C del gen *apoA5* como causantes de estados de hipertriacilgliceridemia postprandial, ya que se piensa que por ser las apolipoproteínas C<sub>3</sub> y A<sub>5</sub> participes del metabolismo lipídico modificaciones en la regulación de la expresión genética de dichas proteínas se traducirían en alteraciones de la funcionalidad metabólica, que darían como resultado estados de hipertriacilgliceridemia. En este trabajo se realiza la importancia de conocer las posibles causas que convergen para el desarrollo de las patologías asociadas a las hiperlipidemias estableciendo al componente genético como un marcador fundamental en la cadena de acontecimientos que conllevan a los estados de hipertriacilgliceridemias.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la posible asociación entre los polimorfismos  $-482C>T$  ;  $-455T>C$  del gen *ApoC<sub>3</sub>* y  $-1131 T>C$  del gen *ApoA5* con la hipertriacilgliceridemia postprandial en sujetos aparentemente sanos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar y comparar los niveles de glucosa basal, triacilglicéridos y colesterol total y fraccionado en estados preprandiales y postprandiales en sujetos aparentemente sanos.
2. Determinar y analizar las frecuencias genotípicas y alelicas de los polimorfismos  $-482C>T$  y  $-455T>C$  del gen *ApoC<sub>3</sub>* y el  $-1131 T>C$  del gen *ApoA5* en los sujetos participantes en el estudio.
3. Comparar y evaluar los niveles de triacilglicéridos con el tipo de polimorfismo  $-482C>T$ ,  $-455T>C$  del gen *ApoC<sub>3</sub>* y el  $-1131 T>C$  del gen *ApoA5* presentes en los individuos del estudio.
4. Asociar la hipertriacilgliceridemia postprandial con los polimorfismos  $-482C>T$  ,  $-455T>C$  del gen *ApoC<sub>3</sub>* y el  $-1131 T>C$  del gen *ApoA5*
5. Evaluar la relación entre los polimorfismos a estudiar de los genes *ApoC<sub>3</sub>* y *ApoA5* con los factores de riesgo cardiovascular en los sujetos en estudio

## CAPÍTULO II.

### MARCO TEÓRICO

#### 1. Antecedentes

En el estudio de Austin, se dice que desde hace ya aproximadamente 3 décadas se han asociado los niveles elevados de TAG en el plasma con un mayor riesgo de padecer enfermedad coronaria<sup>24</sup>.

Zilversmit fue el primero en asociar los niveles de Triacilglicéridos postprandiales con la aterosclerosis, definiéndola como un fenómeno postprandial. Observo que la acumulación de lípidos en las arterias no era solo resultado de una concentración elevada de LDL en el plasma, sino también consecuencia de un proceso normal de absorción y transporte de lípidos<sup>25</sup>.

Ridker, habla acerca de que la aterosclerosis ha sido considerada desde hace ya algún tiempo un trastorno influenciado por efectos postprandiales, ya que una fuente principal de triacilglicéridos circulantes es la grasa proveniente de la dieta, y que además las partículas remanentes de quilomicrones parcialmente hidrolizadas parecen promover la aparición de la aterogénesis. Propone la medición de los valores de TAG en estado postprandial ya que después de todo la mayoría de personas ingiere alimentos 3 veces al día y los TAG tardan aproximadamente entre 8-12h en regresar a los valores basales, por lo tanto la persona se encuentra generalmente durante el día en un estado postprandial; para lograrlo una alternativa sería reconsiderar una prueba de tolerancia oral de TGA, algo parecido a la carga oral de glucosa<sup>26</sup>.

Del mismo modo Russell y col reseñan que durante décadas, debido a la variabilidad de los valores de TAG durante el día, la práctica habitual ha sido la de medir los TAG en muestras de sangre obtenidas después de haber ayunado entre 8 -12h, sin embargo, los valores postprandiales son más representativos del estado metabólico.

Por lo tanto concluyen que la sustitución del protocolo de ayuno de 8-12h por un protocolo de extracción de sangre en el periodo postprandial podría mejorar la predicción de riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) y que la manera más conveniente para poner en práctica este procedimiento sería extraer la

muestra en un rango por ejemplo, de 2-4 horas después de una comida representativa<sup>27</sup>.

En este orden de ideas Garcés y col. 2016 proponen la importancia de la medición de los TAG postprandiales por su alta asociación con ECV; en su estudio evalúan los TAG postprandiales a través de una prueba de tolerancia a las grasas con la administración de una ingesta estandarizada de grasas, y posterior análisis bioquímico a las 2 horas y 4 horas de la ingesta, encontrándose alteraciones que clasificaron a la población del estudio en tolerantes e intolerantes a la carga de 26,3g de grasa, 52,4g de carbohidratos y 15,3g de proteínas para un total de 519 calorías administrada. Del mismo modo proponen valores de referencia para los TAG postprandiales siendo para las 2 horas (49-159) mg/dl y para las 4 horas (47-159) mg/dl los cuales se determinaron en 158 individuos aparentemente sanos de edades comprendidas entre 20 y 59 años habitantes de la gran Caracas<sup>27</sup>

Por otro lado, en aras de dar respuesta a las condiciones individuales que pudieran generar alteraciones en las condiciones de un estado postprandial altamente aterogénico se plantea desde hace ya un tiempo la asociación de los estados de hipertriacilgliceridemia con la presencia de variantes genotípicas que alteren el metabolismo de las partículas lipídicas, dentro de ellas se han reportado polimorfismos asociados a los genes de las apolipoproteínas C<sub>3</sub> y A<sub>5</sub>.

Brown, M. y col. 1972 dilucidaron que la apoC<sub>3</sub> puede inhibir la hidrólisis de los TAG de la VLDL y de los quilomicrones circulantes por la LPL, y con ello inducir hipertriacilgliceridemia. Proponen que tal inhibición causa el aumento de la vida media metabólica de los TAG en el plasma y genera hipertriacilgliceridemia postprandial, lo cual hace de la apoC<sub>3</sub> un modulador crítico en la generación de ácidos grasos a partir de los TAG provenientes de la dieta (quilomicrones) y del hígado (VLDL).<sup>28</sup>

Dammerman y col. 1993, analizaron la secuencia del ADN del promotor *apoC<sub>3</sub>* de sujetos con hiperlipidemia tipo III y con hipertriacilgliceridemia grave revelando cinco polimorfismos distintos<sup>28</sup>.

Waterworth D y col. 1999 describieron en el gen humano *apoC<sub>3</sub>*, que se localiza en el cromosoma 11q23. Una serie de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que se han definido como posibles marcadores genéticos de la hipertriacilgliceridemia. Unos de los más estudiados son los polimorfismos en el elemento de respuesta a la insulina (*-482>T -455T>C*), situado en la región 5' del gen *apoC<sub>3</sub>* y se han asociado con alteraciones en los parámetros lipídicos en varias poblaciones<sup>29</sup>.

Por su parte Miller y col en el año 2007, encontraron polimorfismos del gen promotor *apoC<sub>3</sub>* (*-482C>T, -425T>C*) asociados con el síndrome metabólico (SM)<sup>29</sup>. Estudios semejantes encontraron su asociación del mismo gen con diabetes<sup>30</sup> y resistencia a la insulina<sup>30,31</sup>.

En cuanto a la *apoA<sub>5</sub>* Moreno R y col 2006.; Rensen PC y col 2005; Yan SK y col 2005, han estudiado la presencia del polimorfismo *-1131 T>C* del gen de la *apoA<sub>5</sub>* con asociación a una disminución de la expresión del gen *apoA<sub>5</sub>*, lo que condicionaría un aumento en los niveles de triacilglicéridos y a una mayor predisposición a padecer diabetes mellitus tipo 2, ambos factores de riesgo reconocidos de enfermedad coronaria<sup>32</sup>.

Komurcu-Bayrak E y col. 2008; Olano-Martin E y col. 2008 han realizado estudios en poblaciones de origen oriental y europea, demostrando una asociación importante entre ECV y el polimorfismo mencionado<sup>33, 34</sup>.

Por su parte Vaessen SF col. 2006; Martinelli N y col. 2007 en sus estudios no encontraron asociación entre el polimorfismo *-1131 T>C* del gen de la *apoA<sub>5</sub>* y el desarrollo de hipertriacilgliceridemias<sup>35, 36</sup>.

## **2. Bases Teóricas**

### **2.1 Triacilglicéridos**

La grasa en el ser humano y en la mayoría de los seres vivos es necesaria para la vida. La fuente de ácidos grasos más importante en el hombre es la alimentación. Sin embargo, si se consumen glúcidos, grasas o proteínas en cantidades mayores a las requeridas, el exceso se almacena en forma de triacilglicéridos (TAG), moléculas que conforman la mayor reserva de energía del organismo. Los triacilglicéridos, son acilgliceroles, un tipo de lípidos, formados por una molécula de glicerol, que tiene esterificados sus tres grupos hidroxilo por tres ácidos grasos, saturados o insaturados.

La mayoría de las veces, los seres humanos se encuentran en estado postprandial, y aunque hay una fuerte correlación entre las concentraciones de triacilglicéridos en ayunas y postprandial, este último refleja mejor el metabolismo de los TG. Desde hace varias décadas se han asociado los niveles elevados de TG con el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares<sup>35</sup>.

#### **2.1.1 Metabolismo de los Triacilglicéridos**

A grandes rasgos el metabolismo de los lípidos se da por medio de dos grandes vías metabólicas: la vía exógena que transporta la grasa proveniente de la dieta en forma de quilomicrones (QM) desde el intestino a los tejidos periféricos y al hígado durante los períodos postprandiales y la vía endógena que proporciona la energía necesaria a los tejidos desde el hígado a partir de la secreción de lipoproteínas ricas en TAG<sup>36</sup>.

Después de la ingestión de una comida, la grasa de la dieta y el colesterol son absorbidos por los enterocitos del intestino delgado. Una vez dentro de los enterocitos, el colesterol, junto a los TG es incorporado a los quilomicrones (QM). (Figura 1). Los quilomicrones pasan a los canales linfáticos y después a la circulación sanguínea, donde adquieren las apolipoproteínas: CII, CIII y E. Al pasar a través del endotelio capilar de los tejidos adiposo o muscular, la enzima lipoproteínlipasa (LPL) que se encuentra en la superficie luminal, es activada

por la ApoC2 de los QM, esta enzima hidroliza los TAG de los mismos y permite la captación de los ácidos grasos libres resultantes por las células musculares (aportándoles energía) y los adipocitos (donde se almacenan como reserva). Los remanentes de los QM, que contienen el colesterol de origen intestinal, son captados por receptores hepáticos gracias a la interacción con la Apo E<sup>36</sup>.

La acción de la LPL sobre los QM produce un descenso del orden del 80% al 90% en su contenido en triacilglicéridos. Como consecuencia de esta descarga, la superficie de la lipoproteína se distorsiona y transfiere la mayor parte de apoproteínas A y C a las HDL (Lipoproteínas de alta densidad). De esta manera, los QM se transforman en otros remanentes, que tienen menor tamaño y mayor densidad y están proporcionalmente más enriquecidos en colesterol y Apo E. Esta configuración les permite ser reconocidos por receptores hepáticos específicos de las Apo E, y a su vez ser internalizados y degradados<sup>37</sup>.

Por otra parte, el hepatocito sintetiza y secreta a la sangre las VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad). Éstas, además de gran cantidad de triacilglicéridos de síntesis endógena, transportan también colesterol, tanto de síntesis propia como procedente de la dieta. Las VLDL se metabolizan en dos etapas que implican una serie de cambios semejantes a los que sufrían los QM su transformación en IDL, de menor tamaño y mayor densidad, las cuales a continuación se convierten en LDL. Estas últimas contienen una única apoproteína, la Apo B100, y la fracción lipídica más abundante es el colesterol esterificado. Dado que las LDL transportan dos terceras partes del colesterol circulante en el plasma, estas partículas son las principales proveedoras de colesterol al hígado y a los demás tejidos del organismo.

En el hígado y en la mucosa intestinal se producen las HDL o también pueden ser producto de la degradación de otras partículas como VLDL y QM durante la hidrólisis de triglicéridos que se producen mediante la LPL. Las HDL aceptan el colesterol libre usado de los tejidos periféricos y de las lipoproteínas y lo esterifican gracias a la acción de la lecitina-colesterol acetiltransferasa (LCAT).

El movimiento de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado para su eliminación por la bilis mediante las HDL se denomina “transporte reverso de colesterol”<sup>36</sup>.

Cabe destacar, que cuanto más eficiente es la lipólisis de las VLDL, más altas son las cifras de HDL; esto explica la relación inversa entre la triacilglicéridemia y el HDL.

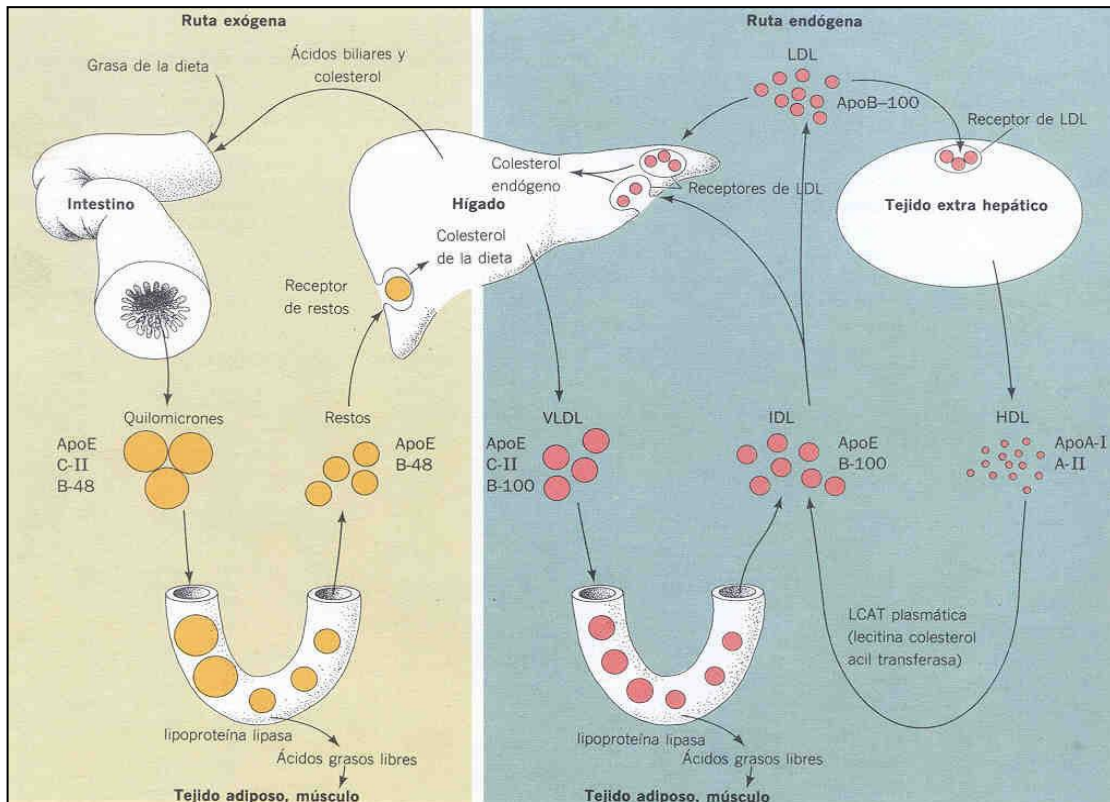


Figura 1. Metabolismo de los lípidos<sup>38</sup>.

### 2.1.2 Metabolismo ineficiente de los triacilglicéridos

Las vías metabólicas involucradas en el metabolismo de los lípidos, son interdependientes, de manera que interrupciones en al menos una, puede afectar la función y productos de la otra<sup>37</sup>.

La proteína transportadora de esteres de colesterol (CETP) es una enzima plasmática que contribuye al correcto transporte de lípidos a sus lugares de destino cuando el metabolismo lipídico es normal, al intercambiar lípidos entre las lipoproteínas ricas en colesterol y las VLDL, sustrayendo colesterol de las

LDL y HDL y transfiriéndolo a las VLDL a cambio de TAG. Sin embargo, cuando hay un retraso de la depuración de las VLDL, la permanencia prolongada de estas partículas en el plasma favorece el intercambio, lo que tiene varias consecuencias adversas<sup>37</sup>.

Un nivel elevado de VLDL es a menudo debido a la sobreproducción de VLDL en el hígado que conduce a la hipertriacilgliceridemia, la cual puede a su vez ser exacerbada por una baja actividad de la lipoproteína lipasa. La VLDL es precursor de IDL, LDL por lo tanto una sobreproducción de la misma suele ir acompañada por una sobreproducción de IDL y LDL. Los defectos que involucran el metabolismo de las LDL se asocia a menudo con aterosclerosis prematura<sup>37</sup>.

En primer lugar, las LDL se enriquecen en TAG, lo que las convierte en un buen sustrato para la lipasa hepática, que hidroliza los TAG, formando LDL “densas y pequeñas”, con un aumento relativo del contenido de Apo B respecto al de colesterol; estas LDL anómalas penetran fácilmente en la pared arterial y son muy susceptibles a la oxidación, por lo que son captadas con avidez por los macrófagos y son, en definitiva, más aterogénicas que las LDL “normales”<sup>37</sup>.

En segundo lugar, las HDL también pierden colesterol y adquieren TAG, que son hidrolizados por la lipasa hepática, con reducción de HDL<sub>2</sub>, las partículas eficientes en el transporte reverso del colesterol, y aumento de HDL<sub>3</sub>, partículas pequeñas y pobres en colesterol con escasa capacidad antiaterogénica. Por último, las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos enriquecidas en colesterol resultantes de este aumento del intercambio lipídico también son aterogénicas, ya que no se captan bien por los receptores hepáticos y sí por los macrófagos de la pared arterial<sup>38,39</sup>.

### 2.1.3 Consecuencias Metabólicas de la Hipertriacilgliceridemia

La hipertriacilgliceridemia que resulta de la producción sea aumentada o disminuida del catabolismo de las TRL (lipoproteínas ricas en triacilglicéridos) influye directamente en la composición de las LDL y HDL y su metabolismo. Por ejemplo, la hipertriacilgliceridemia que puede haber en la resistencia a la insulina (IR) es una consecuencia de la lipólisis de los adipocitos que produce un flujo de AGL hacia el hígado y a su vez el aumento de secreción de VLDL. La mayor producción de VLDL activa la proteína de transferencia de ésteres de colesterol, lo que resulta en el enriquecimiento de triacilglicéridos de LDL y HDL (Figura 2). El contenido de triacilglicéridos dentro de estas partículas es hidrolizado por la lipasa triacilglicérido hepática HTGL, esto origina partículas de LDL y HDL pequeñas y densas. Estudios experimentales sugieren que el HDL en la hipertriacilgliceridemia puede ser disfuncional, y que las partículas de LDL pequeñas y densas pueden ser más susceptibles a las modificaciones oxidativas<sup>39</sup>.

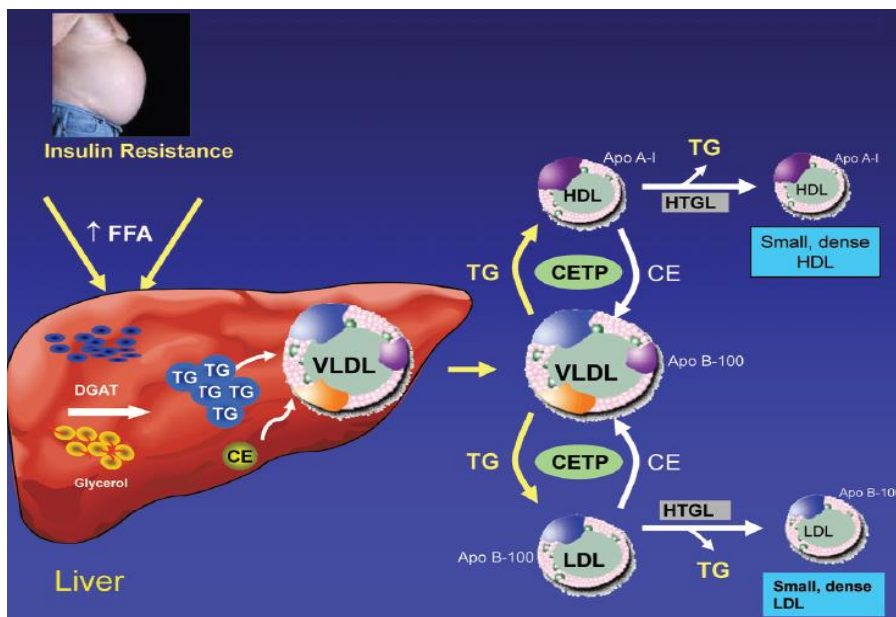


Figura 2. Consecuencias metabólicas de la hipertriacilgliceridemia. Apo A-I indica apolipoproteína A-I; Apo B-100, apolipoproteína B-100; CE, éster de colesterol; CETP, proteína de transferencia de ésteres de colesterol; DGAT, diacilglicerol aciltransferasa; FFA, ácidos grasos libres; HDL lipoproteína de alta densidad; HTGL, lipasa triacilglicéridos hepática; LDL, lipoproteína de baja densidad; TG, triacilglicérido; and VLDL, lipoproteína de muy baja densidad. (Fuente: Miller et al 2011)<sup>39</sup>

## 2.2 Aterosclerosis

La aterosclerosis se describe como una enfermedad multifactorial crónica de tipo inflamatorio, en la cual mecanismos inmunológicos interactúan con factores metabólicos de riesgo para iniciar, propagar y activar lesiones del árbol arterial. La característica más resaltante es el engrosamiento de la pared arterial, debido a una acumulación de lípidos y tejido conectivo en proporción variable y la concomitante reducción en el diámetro del lumen vascular<sup>40,41,42</sup>.

La arterioesclerosis es un proceso que se caracteriza por la presencia de lesiones asimétricas y focales en la capa íntima arterial. Este proceso debe iniciarse por un evento patogénico, que no es necesariamente el mismo para cada paciente. Este aspecto no es sólo de interés científico, sino que también es de suma importancia clínica. Si los estados iniciales de la enfermedad son apropiadamente diagnosticados, preferiblemente por análisis sanguíneos, es posible tomar las medidas necesarias de prevención y tratamiento apropiadas para evitar la progresión de la enfermedad a estados clínicamente relevantes<sup>40</sup>.

La aterosclerosis, es una enfermedad “silenciosa” y de progreso lento cuyos inicios se puede remontar a etapas tan tempranas como la infancia manifestándose clínicamente en la edad adulta. La aparición de lesiones es generalmente focalizada, especialmente en aquellas zonas del árbol arterial donde se producen bifurcaciones, ramificaciones o curvaturas, en donde los patrones de flujo sanguíneo se ven alterados<sup>41</sup>. En los humanos, las lesiones ateroscleróticas aparecen con mayor frecuencia en las arterias carótidas, coronarias, basilar y vertebrales y en las grandes arterias elásticas como la aorta, las ilíacas y las femorales<sup>42</sup>. Los síntomas dependen del lugar donde se desarrolla la aterosclerosis y su evolución, puede conducir a eventos trombóticos, isquémicos y dependiendo del órgano afectado, la muerte del organismo<sup>43</sup>.

### **2.2.1 Fases de formación de la placa de ateroma.**

La hipótesis vigente sobre el origen de la aterosclerosis considera que es una respuesta inflamatoria especializada a diferentes formas de lesión de la pared endotelial<sup>44</sup>. La acumulación de lipoproteínas plasmáticas, especialmente LDL, parece ser uno de los primeros fenómenos en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Las LDL retenidas en la pared sufren procesos de oxidación (LDLox) y generan productos con actividad quimiotáctica para los monocitos circulantes y las células musculares lisas. Los monocitos son atraídos hacia la pared de los vasos, atraviesan el endotelio y una vez en la íntima se diferencian a macrófagos donde captan LDLox. La captación se produce a través de los receptores scavenger, receptores que no están sometidos a regulación, de modo que los macrófagos se cargan enormemente de lípidos y se convierten en células espumosas. La acumulación de células espumosas en la íntima produce las estrías grasas<sup>45</sup>.

**La formación de la placa de ateroma se produce en varias etapas:**

#### **a) Acumulación y modificación de las Lipoproteínas**

Las LDL que circulan en el torrente sanguíneo pueden precipitar en esta misma pared, una vez reconocidas por medio de receptores endoteliales<sup>44</sup>. La estría grasa se forma debido al paso de las LDL que atraviesan el endotelio por un proceso favorecido en los puntos de bifurcación y áreas de curvatura de las arterias. Ciertos factores de riesgo, como la hipertensión o la hipercolesterolemia, favorecen la penetración y la retención de las LDL en la íntima. En condiciones fisiológicas, las lipoproteínas que penetran en el espacio subendotelial se devuelven a la sangre circulante por un mecanismo de transporte inverso del colesterol en el cual participan las HDL; cuando se produce disfunción endotelial, el aumento en la permeabilidad de la pared de los vasos origina un incremento en la penetración de las LDL en la pared vascular que excede la posibilidad del sistema de transporte inverso del Colesterol para devolverlo al torrente sanguíneo<sup>45</sup>.

Esto ocasiona que aumente el período de permanencia de las lipoproteínas dentro del espacio subendotelial donde los proteoglicanos y glicosaminoglicanos presentes interactúan con estas, favoreciendo los procesos de modificación, tanto proteolíticos como oxidativos<sup>45</sup>.

En la oxidación de las LDL intervienen en un primer momento las células endoteliales (produciendo LDL mínimamente modificadas), y posteriormente las células musculares lisas y los macrófagos.

La oxidación de las LDL afecta tanto a los ácidos grasos, que pueden llegar a fragmentarse generando grupos aldehído y cetonas, como a las apoproteínas<sup>46, 47</sup>.

#### **b) Reclutamiento de leucocitos y formación de las células espumosas**

La fuerza de cizallamiento laminar suprime la expresión de las moléculas de adherencia leucocitaria y además incrementa la producción de óxido nítrico (NO) en las células endoteliales. Una disminución de esta fuerza ocasiona una mayor expresión de moléculas de adhesión y disminución del NO, el cual es una de las moléculas sintetizadas por el endotelio que regula un mayor número de procesos homeostáticos locales clasificándose como una molécula ateroprotectora de origen endotelial, tiene propiedades como: vasodilatador, antiagregante plaquetario, inhibidor de la proliferación de las células musculares lisas, antioxidante, inhibidor de la adhesión de monocitos y de la expresión de moléculas de adhesión como ICAM y VCAM<sup>48,49</sup>.

Un componente de las LDLox, como la Lisofosfatidilcolina, la IL-1 y TNF  $\alpha$  incrementa la expresión de VCAM-1. El primer fenómeno celular detectable morfológicamente es la adhesión focal de monocitos y linfocitos circulantes (principalmente linfocitos T) al endotelio y su migración a la íntima. Las células endoteliales segregan un factor quimiotáctico, que es la proteína quimioatrayente de monocitos (MPC-1) que atrae a diferentes células; en este proceso quimiotáctico también colaboran las LDLox.

La activación en la íntima de los monocitos a macrófagos es estimulada por la LDLox y diferentes moléculas producidas por los LoT, las células endoteliales y las células musculares lisas, como el Interferón  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ), el TNF  $\gamma$  y factores estimuladores de la formación de colonias como el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF)<sup>50</sup>.

Los macrófagos poseen la capacidad de fagocitar y eliminar sustancias nocivas, particularmente LDL, mediante una endocitosis mediada por el receptor de LDL (cuyo activador es la Apo B) y también, en casos de hipercolesterolemia o donde se presente una inhibición en la expresión del receptor de LDL en estas células, a través de los receptores scavenger, que captan lipoproteínas modificadas por los intermediarios altamente reactivos generados en el proceso de oxidación<sup>51</sup>.

Estas moléculas se unen de modo covalente con la Apo B, apoproteína mayoritaria de las LDL, modificando su carga global y generando nuevos epítopes. Estas LDL modificadas no son reconocidas por el receptor de las LDL sino por los receptores scavenger. La acumulación masiva de LDLox en el citoplasma de estas células las convierte en células espumosas que formarán el núcleo lipídico de la placa, el cual también es rico en factor tisular. Los macrófagos desempeñan una función primordial en el equilibrio del metabolismo lipídico de la pared arterial durante la aterogénesis dado que ellos pueden abandonar la pared arterial y cumplir con una función limpiadora de lípidos en la arteria; pero en estos casos la tendencia es a acumularse y a estar en mayor cantidad las células que entran que las que salen del endotelio<sup>51</sup>.

### c) **Formación del casquete fibroso**

Los macrófagos son una fuente de factores de crecimiento, citoquinas y otras sustancias que actúan como factores quimiotácticos y estimulantes de la proliferación de las células musculares lisas. En particular, destaca el Factor de Crecimiento derivado de las Plaquetas (PDGF), la IL-1 y el TNF  $\alpha$ .

También produce Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que es potente inductor de la síntesis y secreción de tejido conectivo en las células musculares lisas. A su vez, las células musculares lisas experimentan una transformación fenotípica que afecta su morfología y sobre todo su función; se transforman en células que proliferan activamente, que migran atraídas por agentes quimiotácticos y producen las proteínas de matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglicanos), las cuales formaran la cubierta fibrosa de la placa aportándole estabilidad en el endotelio vascular<sup>52,53</sup>.

### 2.2.2 Factores de riesgo de la aterosclerosis

El término “factor de riesgo cardiovascular” es ampliamente utilizado para describir aquellas características, encontradas en los individuos sanos, que a través de estudios epidemiológicos han sido asociadas a la aparición subsiguiente de enfermedades cardiovasculares<sup>53</sup>. En la Tabla I. se muestran los factores de riesgo que predisponen al padecimiento aterosclerótico, estos pueden clasificarse, según el origen de los mismos, en factores modificables y no modificables.

**Tabla I.** Factores de riesgo aterosclerótico<sup>53</sup>.

Factores Modificables	Factores No modificables
Colesterol sanguíneo elevado	Edad
Tabaquismo	Sexo
Consumo excesivo de bebidas alcohólicas	Historia familiar de enfermedades cardiovasculares u otras enfermedades ateroscleróticas a edad temprana.
Inactividad física / Obesidad / Sedentarismo	
Presión sanguínea elevada	
Hiperglicemia / Diabetes	

Entre los factores modificables, existe una muy fuerte evidencia de que los estilos de vida asociados a la “cultura occidental” (dietas ricas en calorías y grasas saturadas, el hábito tabáquico y la inactividad física) tienen un importante papel como causa de la ocurrencia en masa de enfermedades cardiovasculares. Dichos estilos de vida originan cambios bioquímicos y fisiológicos en los individuos que promueven el desarrollo de la aterosclerosis y los fenómenos trombóticos asociados<sup>53</sup>.

Por otro lado, existe también un importante componente no modificable como la edad, el sexo y la susceptibilidad genética individual a la aterosclerosis<sup>53</sup>.

No obstante, se sabe que la modificación favorable del estilo de vida, reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, lo cual es considerado como la mejor forma de prevenir dichas enfermedades<sup>53</sup>.

### **2.2.3 LDL y Aterogénesis**

La relación de la LDL con la enfermedad cardiovascular aterosclerótica se evidenció con estudios epidemiológicos que mostraron que su riesgo aumentaba en personas con niveles elevados de la lipoproteína<sup>54</sup>. Esta hipótesis fue reforzada cuando demostraron que la ausencia del receptor de LDL producía una enfermedad muy severa de origen genético, llamada hipercolesterolemia familiar, cuyas consecuencias inmediatas eran altos niveles de colesterol en plasma y una aterosclerosis generalizada a temprana edad<sup>54</sup>.

La deposición de lipoproteínas ricas en colesterol en la íntima y su subsiguiente modificación parece ser una condición necesaria y suficiente para el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. En modelos animales usados para el estudio de la aterogénesis, se requiere de un aumento de las concentraciones circulantes de las lipoproteínas que contienen Apo B<sub>100</sub> para que se produzcan lesiones en la íntima arterial. Hasta el momento no se han descrito modelos animales de esta enfermedad, en los que se hayan inducido lesiones similares a las que presentan los humanos sin provocar previamente hiperlipemias, que implican altas concentraciones circulantes de lipoproteínas ricas en colesterol y cuya principal apolipoproteína sea la Apo B<sub>100</sub><sup>55,56</sup>.

Existen otros procesos que pueden contribuir al progreso de las lesiones ateroscleróticas pero no parecen ser suficientes o necesarios. Por ejemplo, no cabe duda de que agentes como el estrés hemodinámico, los procesos inflamatorios crónicos o la hiperhomocisteinemia son capaces de inducir alteraciones morfológicas y bioquímicas en células del endotelio<sup>43</sup>. Sin embargo, en ausencia de hiperlipemias estos estímulos no llevan al desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

En modelos animales con hiperlipemias se desarrollan lesiones incluso en zonas del endotelio intacto en las que no existe estrés hemodinámico<sup>57</sup>. Más aún, en zonas de flujo turbulento proclives al desarrollo de lesiones, la alteración mejor documentada es un aumento en la retención de lipoproteínas Apo B<sup>58</sup>. Todo esto indica que la retención de las lipoproteínas Apo B en la íntima, precede al desarrollo de las lesiones. En el caso de la enfermedad en humanos, en las poblaciones con concentraciones bajas de lipoproteínas Apo B, la incidencia de manifestaciones clínicas de la aterosclerosis es muy baja y por el contrario, es alta en poblaciones con concentraciones moderadas o elevadas de estas lipoproteínas<sup>59</sup>. 23

Diversos grupos han comunicado que en humanos al igual que ocurre en modelos animales, una vez depositadas las lipoproteínas, sufren alteraciones que potencian su aterogenicidad. Estos hallazgos apoyan la idea que en las personas también la lesión aterosclerótica se debe en gran parte a una secuencia de procesos que se inicia con la deposición de lipoproteínas Apo B en la íntima. Una vez depositadas, la aterogenicidad de las lipoproteínas Apo B se ve aumentada por modificaciones estructurales y químicas que sufren en este microambiente<sup>59</sup>.

Cada uno de los componentes de las lipoproteínas Apo B puede ser degradado por reacciones hidrolíticas catalizadas por enzimas que se encuentran en la íntima arterial. Por su localización en la capa más externa de las lipoproteínas, las apolipoproteínas y los fosfolípidos son los componentes a los que tienen acceso las enzimas hidrolíticas. La Apo B puede ser parcialmente fragmentada en polipéptidos, lo que resulta en un cambio en la organización de la superficie de las partículas.

Estos fragmentos pueden permanecer asociados con las lipoproteínas o separarse de ellas, provocando esto último una modificación más drástica en la superficie de la lipoproteína. Por su parte, los fosfolípidos pueden ser hidrolizados por distintas fosfolipasas. Los productos de hidrólisis de los fosfolípidos más abundantes en las lipoproteínas son lisolecitina y ácidos grasos libres (AGL) que pueden ser tomados por la albúmina o activar una serie de mecanismos proinflamatorios. Al degradarse los componentes de la superficie de las lipoproteínas Apo B se desestabiliza la partícula y tiende a formar grandes agregados los cuales son tomados por los macrófagos<sup>59</sup>.

La Figura 3 muestra un esquema de la organización de los componentes de la íntima durante las fases iniciales de la aterogénesis.

A través de este esquema se pretende ofrecer una idea de la complejidad de este microambiente, donde tiene lugar una fracción importante de los procesos de modificación de las lipoproteínas Apo B.

En la Figura 3 se resumen los siguientes pasos: 1) entrada y posible selección de las partículas a través del endotelio; 2) aumento del tiempo de permanencia de las lipoproteínas por asociación con el proteoglicano versicán de la íntima; 3) modificaciones oxidativas e hidrolíticas de las lipoproteínas ApoB retenidas en la íntima; 4) los productos de las modificaciones oxidativas e hidrolíticas de las lipoproteínas Apo B actúan sobre las células de la íntima; 5) estímulo por la lisolecitina y productos de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y oxisteroles de la secreción endotelial de moléculas de adhesión para monocitos; 6) los productos de la modificación de las lipoproteínas inducen la secreción de citoquinas y factores de crecimiento, que quizás sean responsables de la migración y proliferación de las células de la musculatura lisa en la íntima, lo que lleva a una mayor síntesis de matriz extracelular y por lo tanto, a una mayor deposición de lipoproteínas ApoB<sup>59</sup>.

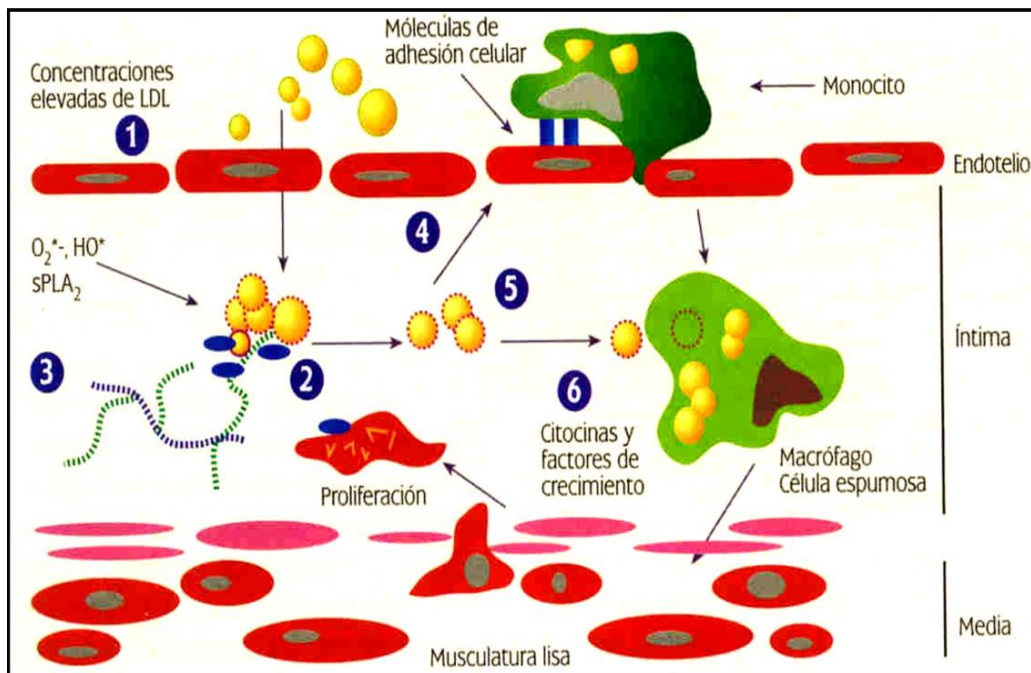


Figura 3. Esquema de los principales procesos que llevan a la deposición y modificación de las lipoproteínas Apo B y sus consecuencias aterógenas (Fuente: Hurt-Camejo y Camejo 1999)<sup>59</sup>.

Un evento determinante en la aterogénesis temprana, es la retención de partículas de LDL en el subendotelio. Varias evidencias apuntan a que el evento clave en esta retención es la agregación y/o fusión de las LDL en la pared arterial. Los agregados de LDL son tomados por los macrófagos *in vitro* en una mayor proporción comparados con LDL no agregada, conduciendo a una acumulación de colesterol en los macrófagos y a la formación de células espumosas<sup>59,60</sup>. Debido a que las partículas de LDL nativas no forman agregados, la modificación de las LDL parece ser un prerequisite para agregación / fusión. Estudios *in vitro* indican que la hidrólisis de las LDL por la fosfolipasa A<sub>2</sub> secretora (sPLA<sub>2</sub>) y esfingomielinasas, podría estar relacionado con la agregación / fusión de LDL y el aumento de la retención en el subendotelio<sup>61</sup>.

### 3. Polimosfismos de las apolipoproteína C<sub>3</sub> y A<sub>5</sub>

#### 3.1 apolipoproteína C<sub>3</sub> (ApoC<sub>3</sub>)

La apolipoproteína C<sub>3</sub> (apoC<sub>3</sub>) es una proteína de 79 aminoácidos que se sintetiza en el hígado y en menor proporción en el intestino.

Se trata de un componente proteico intercambiable entre remanentes de quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad y lipoproteínas de alta densidad. La función *in vivo* de apoC<sub>3</sub> es poco conocida<sup>62</sup>.

Se ha postulado que la apoC<sub>3</sub> puede contribuir al catabolismo disminuido de lipoproteína ricas en triglicéridos a través de un efecto inhibitorio sobre la lipoproteína lipasa desplazando al activador de la LPL el ApoC<sub>2</sub> y/o por inhibición de la captación hepática de lipoproteínas remanentes mediada por la apolipoproteína E (apoE). La apoC<sub>3</sub> también inhibe a la LPL porque en la superficie de las VLDL y de los quilomicrones se orienta y expone sus segmentos cargados negativamente ricos en aspártico y glutámico hacia el medio acuoso, lo cual resulta en una disminución de la carga positiva de la superficie de las lipoproteínas. La carga positiva de las lipoproteínas, es requerida para la inmovilización de las partículas por los glucosaminoglicanos de los proteoglicanos del glicocálix que facilitan la acción enzimática más eficiente, por lo que se obtiene el efecto contrario<sup>63</sup>.

Los estudios que incluyen tanto la variación genética y los niveles circulantes de la proteína han implicado la apoC<sub>3</sub> como un factor de riesgo cardiovascular<sup>63</sup>.

Publicaciones anteriores de la variación de las secuencias en el locus *APOA17C3/A4* han demostrado la asociación con el HDL-c y la hipertrigliceridemia con enfermedades del corazón<sup>64</sup>.

Dos variantes del genotipo de apoC<sub>3</sub> (-482 C>T y -455 T>C) se producen en la región promotora del gen. La expresión de este gen se encuentra normalmente regulada entre un 40% y un 50% por la insulina, y la presencia de un alelo raro de cualquier variante (-455C o -482-T) es suficiente para eliminar la capacidad de la insulina para inhibir la expresión de apoC<sub>3</sub> *in vitro*<sup>64</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que el polimorfismo -482C>T, influye de manera significativa en los niveles de insulina y de glucosa después de la prueba oral de tolerancia a la glucosa en individuos sanos. Los sujetos portadores del alelo -482T poseen niveles elevados de insulina y glucosa en sangre en comparación con los sujetos que son portadores del alelo -482C<sup>65</sup>

Un elemento de respuesta a la insulina ha sido mapeado a un fragmento de cuarenta y dos nucleótidos localizado entre -490 y -449 en relación con el sitio de inicio de la transcripción, y estudios in vitro demostraron que la actividad transcripcional del gen apoC3 sufre down regulation por insulina sólo en el gen que llevan el promotor de tipo salvaje, pero no en los genomas que contienen las variantes C482 + T y T455 + C<sup>66</sup>.

Estos resultados pueden proporcionar la base molecular para comprender los niveles aumentados de apoC3 encontrados en sujetos portadores del alelo raro y su asociación con hipertriacilgliceridemia<sup>66</sup>.

### 3.2 Apolipoproteína A5 (ApoA<sub>5</sub>)

La apolipoproteína A<sub>5</sub> (apoA<sub>5</sub>) fue identificada en el año 2001, simultáneamente por dos grupos de investigadores <sup>67,68</sup>. Se compone de 366 aminoácidos, se produce en el hígado y es codificada por el gen *apoA<sub>5</sub>* que se encuentra íntimamente asociado al *locus* A1/C3/A4, en el cromosoma 11q23<sup>69</sup>. El gen que codifica la apoA<sub>5</sub> está formado por tres exones de 58,111 y 1679pb; y por dos intrones de 112 y 517pb. La expresión del gen se produce a nivel hepático y la secuencia genómica guarda similitud con la de apo A-I y A-IV.

La proteína codificada por el gen de *apoA<sub>5</sub>* se localiza en las partículas HDL y VLDL. Se ha descrito como la apoA<sub>5</sub> se sobreexpresa en la fase precoz de regeneración hepática<sup>68,69</sup>. En estudios en animales, los ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de apoA<sub>5</sub> tienen un descenso del 65% de los niveles de triglicéridos.

Por otra parte, los ratones Knockout para el gen de *apoA<sub>5</sub>*, los cuales no expresan el gen, presentan unos niveles de triglicéridos cuatro veces por encima de la media. Estos cambios en los niveles lipídicos son independientes de apoC<sub>3</sub> <sup>70,71,72</sup>

Se cree que el mecanismo por el cual interviene la apolipoproteína A<sub>5</sub> es mediado por un aumento de la actividad de la lipoproteínlipasa (LPL)<sup>72</sup> o mediante interacción con proteoglicanos que atan LPL en la superficie celular<sup>72</sup>, aumentando la lipólisis de las VLDL y disminuyendo así, la concentración de

TG en ellas. También se ha sugerido que apoA5 podría aumentar el aclaramiento de las VLDL, posiblemente asociado a una disminución de apoB y apoC<sub>3</sub>, y de esta forma disminuir el nivel postprandial de triglicéridos.

Los estudios de asociación genética han mostrado que la apoA<sub>5</sub> tiene un importante papel en los humanos. En la población blanca se han identificado 3 haplotipos: ApoA5\*1 (haplotipo común), ApoA5\*2 (c.1259T>C, IVS3 + 476G>A, 1131T>C y c.-3A>G) y ApoA5\*3, (c.56C>T), que implica el cambio S19W<sup>73</sup>. Cada uno de estos haplotipos incluye uno o más polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

La presencia del polimorfismo -1131T>C, también conocido como SNP3, define el haplotipo ApoA5\*2<sup>74,75</sup>. Para este haplotipo la frecuencia poblacional es 8,0%, en la población blanca. Estudios previos han demostrado que hay una asociación significativa entre los haplotipos ApoA5\*2 (-1131T>C) y el aumento de las concentraciones de triacilglicéridos<sup>75,76</sup>.

## **CAPÍTULO III.**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **1. Tipo de investigación:**

La investigación que se realizará será de tipo experimental, descriptiva y correlacional. Experimental debido a que la forma de obtener los datos es a través de la acción del experimentador, el cual genera el fenómeno que quiere observar y de esta manera lo evalúa. Es también descriptiva, ya que aplicando el método de análisis se logra saber las características y propiedades del objeto o fenómeno estudiado permitiendo así llegar a conclusiones y es de tipo correlacional por cuanto intenta mostrar la relación existente entre las variables.

#### **2. Población y muestra:**

La población estudiada está constituida por individuos aparentemente sanos, adultos, de diferentes edades, que aceptaron participar en el estudio y residentes actuales de la Gran Caracas. La muestra está conformada por ciento sesenta y cinco (175) sujetos seleccionados que cumplen con las características que se requieren para la investigación, los cuales se eligieron a través del instrumento de recolección de datos (anexo B). A todos los individuos incluidos en el protocolo se les informó previamente sobre el objetivo de la investigación así como los riesgos inherentes a la toma de muestra sanguínea y se les dejó en libertad de participar o no en dicho estudio (Anexo A). El protocolo de estudio se realizó bajo las normas de ética de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para trabajos de investigación en Humanos y contó con la aprobación del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas y con el consentimiento informado de los individuos del estudio

#### **3. Instrumento de Recolección de Datos:**

En cuanto al instrumento de recolección de datos, este es una planilla que consta de 4 partes. La primera, recoge los datos personales básicos de cada uno de los individuos como nombre y apellido, fechas de nacimiento, número de cédula, entre otros, una segunda parte llamada antecedentes personales, con la cual se busca conocer si la persona tiene una patología de base, consume algún medicamento, fuma o ingiere licor.

La tercera parte del instrumento son los antecedentes familiares, los cuales nos permitirán conocer si los individuos tienen algún pariente con una patología, cual es esta y su relación filial con esta persona; lo que indicara si hay un mayor riesgo o no de desarrollo de patologías por este motivo. Y la última parte que consta en datos de un examen físico que son la talla, el peso y en base a estos dos parámetros el Índice de Masa Corporal (IMC).

#### **4. Criterios de Inclusión/ Exclusión**

Los criterios de inclusión o exclusión dentro del estudio tendrán que ver mucho con las condiciones o las respuestas obtenidas en la parte número dos (2) del instrumento y la parte número cuatro (4), ya que se buscan personas aparentemente sanas que no deberían tener ninguna patología de base, ni ninguna condición que genere alteraciones a su organismo como fumar o ingerir bebidas alcohólicas; así como no deberán tener sobrepeso lo cual será reflejado por el IMC.

#### **5. Análisis estadístico:**

Los datos obtenidos de las muestras, se analizarán mediante estadística descriptiva y diferencial. Los mismos se tabularan y/o graficaran mostrando los valores promedio ( $\bar{X}$ ) más o menos una desviación estándar ( $\bar{X} \pm 1DS$ ). Las comparaciones de ( $\bar{X} \pm 1DS$ ) se realizaran empleando la prueba estadística ANOVA ONE WAY, utilizando un programa estadístico SigmaPlot\_11.

#### **5.1 Prueba de equilibrio de distribución genética de Hardy-Weinberg (H-W)**

Se realizó la prueba de equilibrio para la distribución genotípica en los individuos en estudio de acuerdo a Hardy-Weinberg (H-W). La significancia (p) del desequilibrio de los genotipos se calculó con la prueba de  $\chi^2$  de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \sum (O-E)^2 / E$$

Donde O es el valor de las frecuencias observadas y E el valor de las frecuencias esperadas. La significancia (p) del mismo se buscó en la tabla de  $\chi^2$  con 1 grado de libertad. Usando el programa Max Lik basado en el método de verosimilitud.

## 5.2 Frecuencia alélica y genotípica

Para el estudio comparativo entre los individuos tolerantes y los individuos intolerantes para los polimorfismos se evaluaron las frecuencias alélicas (FA) para cada gen, fueron obtenidas por conteo directo a partir de los genotipos asignados a cada individuo. Se determina el número de veces que se observa el alelo y se divide entre dos veces el número total de individuos estudiados (N).

$$FA = \frac{\text{n}^\circ \text{ veces que se observa el alelo}}{2N}$$

2N

Las frecuencias genotípicas para cada gen, fueron obtenidas por conteo directo a partir de los genotipos asignados a cada individuo. Se determina el número de veces que se observa el genotipo y se divide entre el número total de individuos estudiados (N).

$$FG = \frac{\text{n}^\circ \text{ veces que se observa el genotipo}}{N}$$

N

## 5.3 Pruebas de Asociación

Para evaluar las diferencias entre los individuos tolerantes y los individuos intolerantes y establecer la asociación del gen ApoC3, y ApoA5 con la hipertrigliceridemia postprandial, se calcularon los valores de significancia (probabilidad  $p$  menor o igual a 0,05) mediante la prueba exacta de  $X^2$  Mantel-Haenszel, usando tablas 2x2. La  $p$  corregida ( $p_c$ ), se obtuvo multiplicando el valor de  $p$  por el número de comparaciones efectuadas<sup>77</sup>.

$$X^2 = \frac{n \{ad-bc\} - \frac{1}{2} n^2}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}$$

$$(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)$$

Donde:  $X^2 = \text{Ji-Cuadrado con corrección de Yates}$

$n =$  número total de individuos

$a, b, c, d =$  valores numéricos de las celdas de la tabla 2x2

#### 5.4 Odds Ratio

El OR es usado para estimar el riesgo en estudios caso-control en los cuales los cálculos de riesgo relativo no son apropiados. Un OR < 1 indica protección, mientras un OR >1 indica un riesgo incrementado. El OR se calculó de acuerdo con la formula de Woolf<sup>77</sup>.

$$OR = \frac{\text{Odds de exposición en casos}}{\text{Odds de exposición en controles}} = \frac{a/b}{c/d} = \frac{ad}{bc}$$

$$\text{Odds de exposición en casos} = \frac{a \times (a + b)}{b \times (a + b)} = a/b$$

$$\text{Odds de exposición en controles} = \frac{c \times (c + d)}{d \times (c + d)} = c/d$$

Donde:

**Tabla N° II.** Calculo de riesgo según la fórmula de Woolf (OR)

	Factor de riesgo presente	Factor de riesgo Ausente	Total
Casos	A	B	a + b
Control	C	D	c + d
Total	a + c	b + d	

a= número de pacientes con el factor de riesgo (alelo, genotipo, combinación)

b= número de pacientes sin el factor de riesgo

c= número de individuos sanos con el factor de riesgo

d= número de individuos sanos sin el factor de riesgo

## 5.5 Relación estadística

Los parámetros bioquímicos se procesaron mediante el software estadístico SPSS versión 23 y, se analizaron siguiendo los procedimientos estadísticos recomendados por la Federación Internacional de Química Clínica. Los supuestos de normalidad se verificaron mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov y, de igualdad de varianzas a través del método de Levene, con un intervalo de confianza del 95%. Por otro lado, con el fin de determinar si existen correlaciones significativas entre los parámetros bioquímicos y los polimorfismos genéticos estudiados entre los grupos tolerantes (control) e intolerantes a las grasas, se realizó una correlación de Pearson.

### **B. Diseño de la metodología: Recursos, materiales y técnicas:**

#### 1. Muestras sanguíneas

A los sujetos se les extrajo 10 mL de sangre en ayunas (12 horas aproximadamente), la muestra fue extraída por punción venosa, previa asepsia de la región anterior del brazo, y tomando las medidas y consideraciones necesarias para evitar la éxtasis venosa y hemólisis. Posteriormente se les suministró un desayuno que consiste en una (1) empanada y un café con leche con una carga de 26,3g de grasa, 52,4g de carbohidratos y 15,3g de proteínas para un total de 519 calorías y bajo la misma técnica se tomaron 10mL de sangre a las 2 horas y 10mL de sangre a las 4 horas posterior a la ingesta de este alimento. A las muestras, se les determinó:

#### 2. Química Sanguínea:

Las muestras se procesaron con el instrumento *Modular Analytics* de *Roche Diagnostics*, el cual posee la Potenciometría (ISE) como principio de medición para la evaluación de los parámetros; se determinaron niveles de:

- Glucosa: determinación de valores basales.
- Colesterol total: determinación de valores basales, postprandial 2 horas y postprandial 4 horas

- Triglicéridos: determinación de valores basales, postprandial 2 horas y postprandial 4 horas.

### **C. Determinación de genotipo**

#### **1. Extracción de ADN genómico.**

La extracción del ADN se realizó por el método de Bunce modificado, siguiendo el protocolo presentado a continuación<sup>78</sup>:

Primera Etapa:

1. Se extrae 4 mL de sangre total a cada uno de los individuos participantes.
2. La muestra de sangre se trasvasa a un tubo cónico de 15 mL.
3. Se añade 9 mL de RCLB (Red Cells Lysis Buffer) y mezclar por inversión varias veces. Se congela la muestra a -20° C por 30 minutos o hasta el día siguiente, aumentando la lisis de los glóbulos rojos.
4. Se centrifuga a 3.000 xg durante 30 minutos.
5. El sobrenadante se descarta y se añade nuevamente 9 ml de RCLB. Se centrifuga a 3.000 xg durante 30 minutos.
6. El sobrenadante se descarta y se añade al pellet 600 µL de NBL + SDS (Buffer de lisis de glóbulos blancos + Dodecil Sulfato de Sodio) , que será transferido a un vial de 2 ml y se incuba a 56° C durante 3 horas o hasta que se disolviera el pellet.

Segunda Etapa:

7. Una vez disuelto el pellet se añade 100 µL de NaCl 6M y se mezcla vigorosamente con vórtex.
8. Luego se añade 600 µL de cloroformo y se agita hasta la formación de una emulsión lechosa. Se centrifugó a 10465 xg durante 15 minutos.
9. La fase acuosa (superior), que contiene el ADN disuelto, se transfiere a un vial de 2 ml nuevo.
10. Se añade 1 ml de etanol 100% a -4°C y se agita por inversión varias veces hasta que la red de ADN precipite (si esta no se observa, dejar a -20° C durante la noche).
11. Luego se centrifuga a 10465 xg por 5 minutos y se descarta el sobrenadante.

12. Se añade en 1 ml de etanol 70% a  $-4^{\circ}\text{C}$  y se centrifuga a  $10465 \times g$  por 5 minutos
13. Se descarta el sobrenadante y se dejan los tubos abiertos durante 30 minutos para eliminar el etanol
14. Finalmente, se agrega 80  $\mu\text{L}$  buffer TE esterilizado y se incuba a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.
15. Una vez finalizado el paso anterior, el ADN genómico está listo para cuantificar o hacer PCR.

## **2. Cuantificación de ADN**

La concentración de ADN fue medida en un biofotómetro (Eppendorf®) a 260nm para asegurar haber extraído una cantidad óptima de material genético y verificar su pureza.

Empleando la medición a longitudes de onda de 260/280 se conoce la integridad del ADN, esta relación debe estar entre 1.8 y 2.0, valores por debajo de este intervalo indica poca cantidad de ADN y valores por encima indican ADN degradado. (BioPhotometer Plus, 2007).

### ***D. IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPO DE APOC<sub>3</sub>***

#### **1) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El ADN genómico fue amplificado por PCR (termociclador de marca “sens quest labcycler”). Utilizando los siguientes “primers” o iniciadores<sup>79</sup>

*Primer Forward:* 5'-GTGAGAGCTCAGCCCCTGTAA-3'

*Primer Reverse:* 5'-TTTCACACTGGAAATTCAGG-3'

El tamaño del producto que se origina, es de 194pb que incluye los polimorfismos -482C>T y -455T>C; las condiciones generales de la PCR son las siguientes:

- Mezcla de PCR: Buffer green 1X (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM de cada primer, 0,25 U de la enzima Taq-Polimerasa (Promega) y agua tridestilada hasta completar un volumen final de 20μL. Se utilizaron 5 μl de ADN genómico (aproximadamente 100ng), para un volumen total de reacción de 25μl.
- Condiciones de PCR: La mezcla de reacción se somete a una desnaturalización inicial a 94° C durante 5 minutos seguida de 35 ciclos compuestos por desnaturalización de 1 minuto a 94°C, alineamiento por 1 minuto a 58°C y una fase de extensión de 1 minuto a 72°C, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C.
- La calidad del producto de amplificación se verifica realizando una electroforesis, en la cual se agrega 8 μl del producto de PCR en el gel de agarosa al 2% coloreado con SYBR® SAFE, se incluye un ADN ladder de 25pb como marcador de peso molecular y un control negativo (mezcla de PCR + agua destilada en lugar del ADN genómico).

## **2) Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)**

Se procedió a realizar la digestión enzimática del fragmento amplificado (RFLP)<sup>79</sup> con dos enzimas de restricción distintas, las cuales son MspI y BtsCI. Al digerir con la enzima de restricción MspI (-482) la presencia del alelo C se detectó al obtenerse tres bandas de 148pb, 30pb y 16 pb la del alelo T al observarse dos bandas de 164pb, 30pb. Los individuos heterocigotos "C/T" en -482 presentaron las cuatro bandas: 164, 148, 30 y 16 pb.

Al digerir con la enzima de restricción BtsCI (-455) la presencia del alelo T se evidencia al obtenerse dos bandas de 122pb y 72pb y la del alelo C al observarse una sola banda de 194pb, indicando que la digestión enzimática no se realizó debido a la ausencia del sitio de restricción. Los individuos heterocigotos "C/T" en -455 presentaron las tres bandas: 194, 122 y 72 pb.

- Mezcla de RFLP: se realizarán dos ensayos de RFLP se trabajo con dos enzimas de restricción distintas, siguiendo el siguiente protocolo:
  - MspI: Buffer B 1X (Promega), 1µg/µl de BSA (Promega), 2 U de enzima de restricción MspI, agua tridestilada y 4 ul de producto de PCR.
- Condiciones para RFLP: se incuba a 37°C por un mínimo de tres (3) horas para el proceso de digestión.
  - BtsCI: Buffer 2 (BioLabs), 2 U de enzima de restricción BtsCI (BioLabs), agua tridestilada, y 4 ul de producto de PCR.
- Condiciones para RFLP: se incuba a 37°C por dieciséis (16) horas para el proceso de digestión.
  - El resultado de digestión se observa realizando una electroforesis con 10 ul del producto de RFLP en un gel de acrilamida al 10%, conjuntamente con los respectivos controles.
  - La coloración del gel se realiza con nitrato de plata al 0.15 % en agua. Se sumerge el gel en 50 ml de solución fijadora, se descarta dicha solución y se lava con agua bidestilada, luego se sumerge nuevamente el gel, pero esta vez en nitrato de plata, se agita durante 10 minutos, se lava y se revela con 50 ml de solución de formaldehido al 0.4 % en hidróxido de sodio 1.5% en H<sub>2</sub>O por 15 minutos y finalmente se lava con agua corriente.

Al terminar la electroforesis se visualiza la migración del ADN en el gel de Acrilamida al 2% utilizando el sistema compacto y automatizado para realizar el escaneo de geles denominado Gel Doc™ XR+ System de la casa comercial Bio-Rad.

## E. IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPO DE *APOA5*

### 1) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN genómico fue amplificado por PCR (termociclador de marca "sens questla bcycler"). Utilizando los siguientes "primers" o iniciadores<sup>80</sup>:

*Primer Forward:* 5'-GGAGCTTGTGAACGTGTGTATGAGT-3'

*Primer Reverse:* 5'-CCCCAGGAACTGGAGCGAAATT-3'

El tamaño del producto que se origina, es de 154pb que incluye el polimorfismo -1131T>C; las condiciones generales de la PCR serán las siguientes<sup>80</sup>

Mezcla de PCR: Buffer green 1X (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM de cada primer, 0,25 U de la enzima Taq-Polimerasa (Promega) y agua tridestilada hasta completar un volumen final de 20µL. Se utilizaron 5 µl de ADN genómico (aproximadamente 100ng), para un volumen total de reacción de 25µl.

1. Condiciones de PCR: La mezcla de reacción es sometida a una desnaturalización inicial a 96° C durante 5 minutos seguida de 30 ciclos compuestos por desnaturalización de 30 segundos a 96° C, alineamiento por 30 segundos a 58° C y una fase de extensión de 30 segundos a 72° C, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72° C.
2. La calidad del producto de amplificación se verifica realizando una electroforesis, en la cual se agrega 8 µl del producto de PCR en el gel de agarosa al 2% coloreado con SYBR® SAFE, se incluye un ADN ladder de 25pb como marcador de peso molecular y un control negativo (mezcla de PCR + agua destilada en lugar del ADN genómico).

## **2) Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)**

Se procede a realizar la digestión enzimática del fragmento amplificado (RFLP)<sup>80</sup> con la enzima MseI. Al digerir con la enzima de restricción MseI (-1131) la presencia del alelo T se detectó al obtenerse dos bandas de 133pb y 21pb y la del alelo C al observarse una sola banda de 154pb, indicando que la digestión enzimática no se realizó debido a la ausencia del sitio de restricción. Los individuos heterocigotos "C/T" en -1131 presentaran las tres bandas: 154, 133 y 21pb.

1. Mezcla de RFLP: se realizarán dos ensayos de RFLP trabajando con la enzima de restricción MseI, siguiendo el siguiente protocolo:

MseI: Buffer B 1X (Promega), 1µg/µl de BSA (Promega), 2 U de enzima de restricción MspI, agua tridestilada y 4 ul de producto de PCR.

2. Condiciones para RFLP: se incuba a 37°C por un mínimo de tres (3) horas para el proceso de digestión.
3. El resultado de digestión se observa realizando una electroforesis con 10 ul del producto de RFLP en un gel de acrilamida al 10%, conjuntamente con los respectivos controles.
4. La coloración del gel se realiza con nitrato de plata al 0.15 % en agua. Se sumerge el gel en 50 ml de solución fijadora, se descarta dicha solución y se lava con agua bidestilada, luego se sumerge nuevamente el gel, pero esta vez en nitrato de plata, se agita durante 10 minutos, se lava y se revela con 50 ml de solución de formaldehído al 0.4 % en hidróxido de sodio 1.5% en H<sub>2</sub>O por 15 minutos y finalmente se lava con agua corriente.

Al terminar la electroforesis se visualiza la migración del ADN en el gel de Acrilamida al 2% utilizando el sistema compacto y automatizado para realizar el escaneo de geles denominado Gel Doc™ XR+ System de la casa comercial Bio Rad.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### A.RESULTADOS

##### 1. Características generales de los individuos en estudio:

Se estudiaron 175 individuos, de los cuales 68 son hombres y 107 son mujeres. Los individuos fueron clasificados según sus niveles de TG postprandiales en: tolerantes a las grasas n=127 (72,57 %) e intolerantes a las grasas n=48 (27,43%), La edad media del grupo control “tolerantes” fue  $30,63 \pm 11,62$  años y del grupo de casos “intolerantes” fue  $31,75 \pm 9,59$ , como puede observarse en el gráfico 1.



Gráfico 1. Distribución de la muestra por grupos, dependiendo sus niveles de TG postprandiales: Grupo tolerante (Control) e intolerante.

##### 2. Variables bioquímicas y clínicas analizadas en los individuos del estudio según grupo.

En la tabla N° I se presentan los parámetros bioquímicos obtenidos para cada uno de los grupos en estudio. Estos son expresados como la media  $\pm$  una desviación estándar junto con los valores de referencia para cada parámetro.

**Tabla N° I.** Parámetros bioquímicos y clínicos de los individuos en estudio

<b>Parámetros Bioquímicos y clínicos</b>	<b>Grupo Tolerante a las Grasa <math>\bar{x} \pm DS</math></b>	<b>Grupo Intolerantes a las Grasas <math>\bar{x} \pm DS</math></b>
<b>Edad</b>	31±12	32±10
<b>Peso (kg)</b>	62±9	64±12
<b>IMC</b>	22.6±2.2	23±2.6
<b>Glucosa ( mg/dl)</b>	88 ±4*	92 ±10*
<b>Insulina</b>	9.02±4.02	9.7±5.03
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	183±41	187±39
<b>HDL-C (mg/dl)</b>	51±11***	40±11***
<b>VLDL-C (mg/dl)</b>	19±7***	24±8***
<b>LDL-C (mg/dl)</b>	113±36	123±37
<b>TG basal (mg/dl)</b>	96±35***	121±38***
<b>TG postprandial 2h (mg/dl)</b>	110±34***	172±49***
<b>TG postprandial 4h (mg/dl)</b>	105±34***	168±59***
<b>Col/HDL</b>	3.7±1.03***	5.1±2.4***
<b>LDL/HDL</b>	2.3±0.93**	3.5±2.1**
<b>Tg/HDL basal</b>	2.01±0.97***	3.4±1.9***
<b>HOMA</b>	1.95±0.92	2.2±1.3

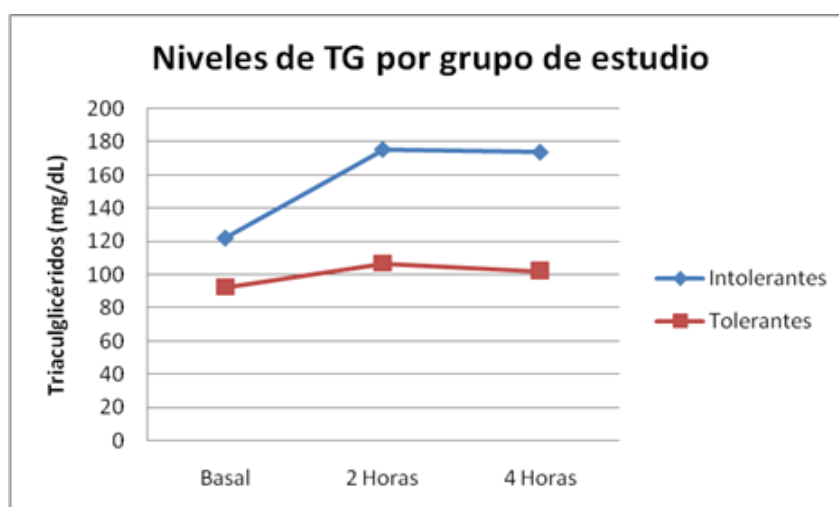
Los Grupos tolerantes e intolerantes fueron estadísticamente evaluados con el Test de student y un nivel de significancia  $\alpha= 0.05$ . \* $p<0.05$  \*\* $p<0.005$  \*\*\* $p<0.0001$

Los parámetros bioquímicos, cumplieron el supuesto de normalidad, comprobándose su ajuste a la distribución normal mediante el test de Kolmogorov Smirov, con un nivel crítico correspondiente al 0,05 de significación.

Puede observarse que no existe diferencia significativa entre el grupo tolerante e intolerante para las variables Edad, Sexo, Peso, IMC, Insulina, Colesterol, LDLc, HOMA<sub>ir</sub>. Mientras que las variables Glucosa, HDLc, VLDLc, TAG basal, TAG 2Horas, TAG 4H si se evidencio una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos con valores de  $p < 0,001$ .

Evaluando el comportamiento del metabolismo de los TAG por grupo de estudio se observa que en el grupo de intolerantes los valores son más elevados que el grupo de los tolerantes y dichos valores son a las 2 y 4 horas superiores al intervalo de referencia, lo cual permitió hacer la respectiva agrupación de los sujetos, teniendo como punto de corte un aumento en más de un 30% de sus valores basales.

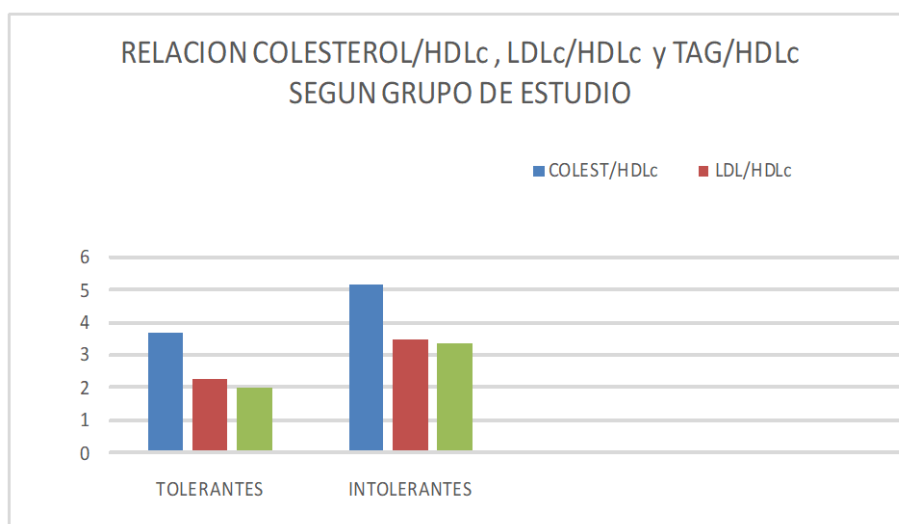
Para la evaluación del comportamiento metabólico de los lípidos se registró como se observa en el gráfico N° 2 la cinética de los TAG en ayunas y postprandiales (2H y 4H) en los grupos en estudio. Donde, los TAG para el grupo de los controles comienza con una media basal inferior a los 100 mg/dL a diferencia del grupo intolerante que presenta una media de valores por encima de 121 mg/dL, mientras que a las 2 horas de la ingesta de la carga estándar se obtiene un valor máximo para ambos grupos siendo mucho mayor el aumento para los intolerantes, los cuales sobrepasan el intervalo de referencia (mayor de 159 mg/dL) y no disminuyen por debajo de este a las 4 horas.



**Gráfico 2** comportamiento de los TAG en los individuos por grupo de estudio

Se evaluaron como predictores aterogénicos a la población del estudio el índice de Castelli, la relación LDLc/HDLc, y la relación TAG/HDLc cuyos resultados se muestran en la tabla N I,

Para visualizar las relaciones de los indicadores aterogénicos según grupo de estudio se presenta el siguiente gráfico N 3



**Gráfico 3.** Índice de Castelli, relación LDL/HDLc y TAG/HDLc por grupo de estudio.

En esta gráfica puede observarse que los índices aterogénicos tienen una media de 5.17 lo que es mayor al punto de corte establecido para Colesterol total/HDLc  $< 5$  para el grupo intolerantes y el grupo tolerantes obtuvo una media de 3.7 la diferencia estadística entre los grupos fue de  $p < 0,0001$ , con respecto al índice LDLc/HDLc el grupo de intolerantes obtuvo una media de 3.49 valor muy cercano al punto de corte establecido para este índice que debe ser  $< 3,6$ , por su parte el grupo de Tolerantes obtuvo un valor medio para el mismo índice de 2.33 la diferencia estadística fue de  $p < 0,005$  finalmente el índice TAG/HDLc obtuvo una media en el grupo intolerante de 3,04 y en el tolerante de 2,01 con una significancia  $p < 0,0001$  (Tabla I).

Conociendo el comportamiento de los indicadores aterogénicos se proyecta el análisis de los Riesgos Relativos según grupo de estudio en la tabla N°II.

Donde se muestran la cantidad de individuos que presentan la relación colesterol Total/ HDL mayor o menor que 5 y la relación LDLc/HDLc mayor o menor que 3,6.

**Tabla N° II.** Riesgo Relativo (RR) para los grupos en estudio

	<b>Intolerantes <i>n</i>=48</b>	<b>Tolerantes <i>n</i>=127</b>	<b>RR (IC 95%)</b>	<b><i>P</i></b>
<b>Rel Col/HDLc &gt; 5</b>	20	13	3.074(1.886-4.579)	0,002*
<b>Rel Col/HDLc &lt; 5</b>	28	114	0.649(0.508-0.831)	
	<b>Intolerantes <i>n</i>=48</b>	<b>Tolerantes <i>n</i>=127</b>	<b>RR (IC 95%)</b>	<b><i>P</i></b>
<b>Rel LDL/HDLc &gt; 3,6</b>	16	13	2.417(1.418-3.713)	0,002*
<b>Rel LDL/HDLc &lt; 3,6</b>	32	114	0.742(0.602-0.914)	

### 3. Caracterización genética de los individuos de estudio.

#### **AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS -482 Y -455 DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE APOC<sub>3</sub>**

En la figura 1 se visualizan los productos amplificados de 194 pb correspondientes a las regiones -482 y -455 del gen *ApoC<sub>3</sub>*.

**FIGURA 1**

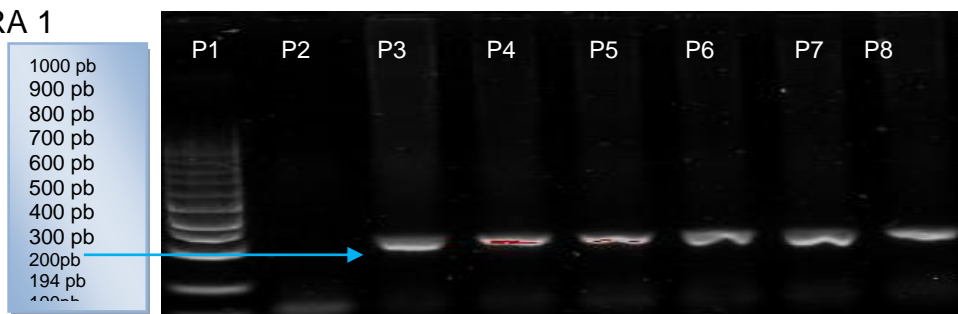


Figura 1. Visualización de los productos amplificados correspondientes a la región del gen *ApoC<sub>3</sub>*, mediante electroforesis en gel de agarosa al (2%) en buffer TBE 1X, coloreado con SYBR®SAFE. El pozo número 1 corresponde al marcador molecular (MP) de 100 pb (PROMEGA). Los carriles 3, 4, 5, 6, 7,8 corresponden a los productos amplificados (194 pb) y el carril 2 corresponde al control negativo.

### TIPIFICACION DE LA VARIANTE -482 C>T DE LA REGION PROMOTORA DEL GEN *APOC<sub>3</sub>*

Posteriormente, los productos amplificados fueron digeridos con la enzima de restricción *MspI* (PROMEGA), visualizándose en geles de poliacrilamida al 10%, coloreado con nitrato de plata. De donde se generan productos de:

- ✓ Dos bandas 164pb y 30 pb para el genotipo homocigoto T/T
- ✓ Tres bandas 148 pb, 30 pb, 16 pb corresponde al genotipo homocigoto C/C.
- ✓ Cuatro bandas 164 pb, 148 pb, 30 pb, 16 pb para genotipo heterocigoto C/T

FIGURA 2

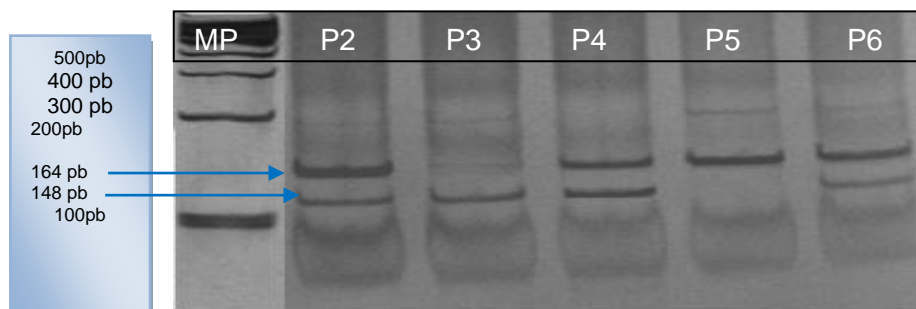


Figura 2. Visualización de los productos obtenidos tras la digestión para la región -482 C>T del gen *ApoC<sub>3</sub>* con la enzima *MspI*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) en buffer TAE 1X. El carril número 1 corresponde al marcador molecular (MP) de 100 pb (PROMEGA). En el carril 2, 4 y 6 genotipo heterocigoto CT, carril 3 genotipo homocigoto C, carril 5 genotipo homocigoto T.

NOTA: las bandas de 30 pb y 16 pb no se visualizan en el gel de poliacrilamida al 10% debido que para lograr una mejor separación de las bandas de mayor peso el tiempo de corrida fue de 20 minutos, momento para el cual las bandas de menor peso molecular se escapan del gel.

### FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO -482 C>T DEL GEN APOC<sub>3</sub>

En el grupo estudiado la distribución genotípica del polimorfismo -482 C>T del gen ApoC<sub>3</sub>, está en equilibrio de Hardy Weinberg ( $X^2= 0,353009606$  p =0,552414).

Como se observa en la Tabla III en los dos grupos de individuos tipificados genotípicamente, se encontró la presencia de los tres posibles genotipos (CC, CT, TT), presentando el genotipo del modelo dominante TT+CT la mayor frecuencia 73%, seguido por el genotipo CC 27% con frecuencia alélica total de 53% para el alelo silvestre C y 47% para el alelo de riesgo T, en la clasificación según grupo de estudio se observó que el grupo de intolerantes presento una frecuencia de los genotipos de TT+CT 85%, y el CC 15% y una frecuencia alélica de 56% alelo T y 44% alelo C por su parte el grupo de tolerantes presento genotipos de TT+CT en 68%, y el CC 32% y una frecuencia alélica de 57% alelo C y 43% alelo T

**TABLA N° III** Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -482 C>T del gen ApoC<sub>3</sub> en los grupos de estudio.

<b>-482 C&gt;T ApoC<sub>3</sub></b>	<b>Tolerantes a los lípidos (n= 127)</b>	<b>Intolerantes a los lípidos (n= 48)</b>	<b>Total (n= 175)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>P</b>
<b>Genotipos</b>					
<b>CC</b>	32(41)	15 (7)	27 (48)	0,358 (0,148-0,866)	0,0098
<b>TT+CT</b>	68 (86)	85(41)	73(127)	2,792 (1,154-6,756)	0,0098
<b>Alelos</b>					
<b>C</b>	57 (145)	44 (42)	53 (187)	1,065 (1,154- 2,7464)	0,013
<b>T</b>	43 (109)	56 (54)	47(163)	0,584 (0,148-0,866)	0,013

NOTA: Los valores mostrados en paréntesis representan el número de veces que se repite el alelo o el número de individuos portadores del genotipo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje.

La agrupación de los genotipos se realizó bajo el Modelo de herencia genotípica dominante que es el que mejor se adapta, este modelo supone que una única copia de T (alelo de riesgo) es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos TC y homocigotos TT tienen el mismo riesgo asociado.<sup>81</sup>

Se encontró que los portadores del genotipo *TT + CT* presentan un OR: 2,792 (IC95%1,154-6,756) con un  $p < 0,0098$  en el grupo de intolerantes en comparación al grupo control. Por otra parte, los portadores del genotipo *CC* presenta un OR 0,358 (IC95%0,148-0.866)

## **ESTUDIO DE RELACIÓN DE LAS VARIABLES BIOQUIMICAS Y CLINICAS SEGÚN GENOTIPO PARA LA REGIÓN -482**

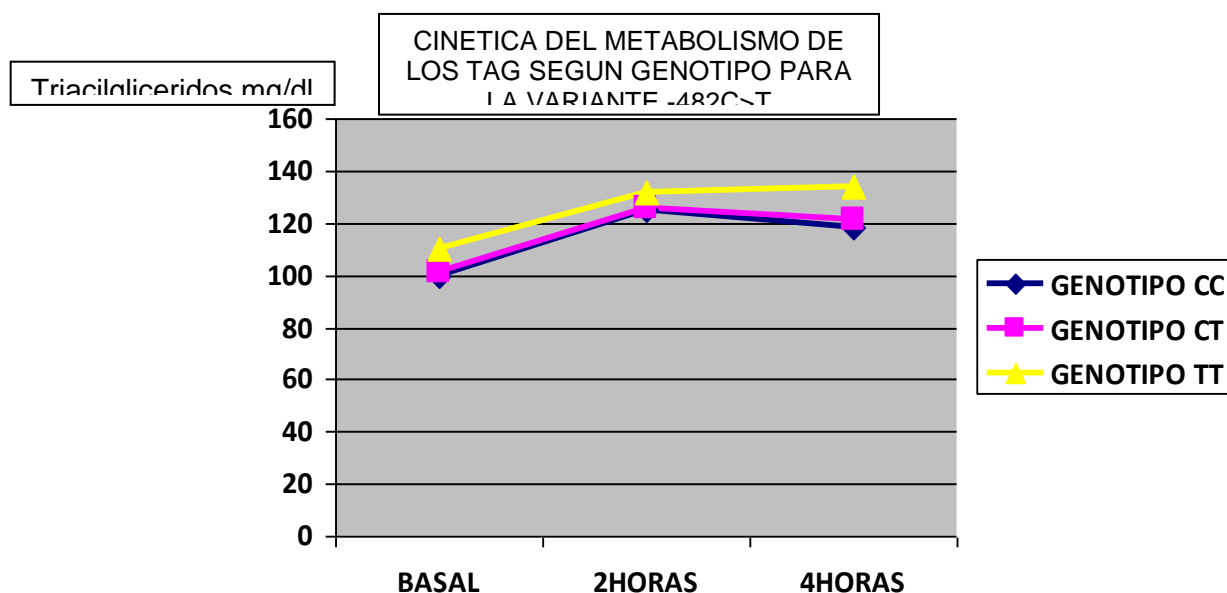
Para conocer las asociaciones entre los parámetros bioquímicos y las variables antropométricas con los genotipos posibles CC, CT, TT se evaluó el estadístico Test de student con un nivel de significación  $\alpha = 0.05$ , tal como se muestra en la tabla IV

**Tabla Nº IV.** Parámetros bioquímicos y clínicos de los individuos del estudio según genotipo para la variante -482 C>T del gen *ApoC<sub>3</sub>*

<b>Parámetros</b>	<b>Genotipo</b>			<b>Valores de Referencia</b>
	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>	
<b>Glucosa mg/dL</b>	88,9±7,5	89,1±9,8	89,0±9,1	70-100
<b>TG (basal) mg/dL</b>	100,1±41,8	101,2±30,8	110±44,6	30-150
<b>TG (2H) mg/dL</b>	125,5±57,8	126,8±44,2	132,0±49,7	49-159
<b>TG (4H) mg/dL</b>	118,5±50,0	120,8±47,1	134,1±62,5	47-159
<b>CoIT mg/dL</b>	176,4±38,3	187,9 ±39,4	184,0±43,5	0-200
<b>HDL-c mg/dL</b>	47,8±11,3	48,3±12,1	45,7±13,2	40-60
<b>LDL-c mg/dL</b>	108,5±37,8	119,3±34,9	116,2±39,0	0-159
<b>VLDL-c mg/dL</b>	20,0±8,3	20,2±6,1	22±8,9	15-44
<b>Insulina (UI/ml)</b>	9,0±4,1	9,1±4,2	9,8±4,6	5-14
<b>Relación Clolesterol/HDLc</b>	4,0±2,1	4,1±1,4	4,3±1,5	<5
<b>Relación LDLc/HDLc</b>	2,4±1,8	2,6±1,2	2,7±1,3	<3,6
<b>IMC Kg/m<sup>2</sup></b>	22,9±2,3	22,5±2,3	23,1±2,5	19-24,4
<b>HOMA<sub>ir</sub></b>	1,8±1,0	1,8±1,2	2,1±1,1	<2,5

\*Nivel de significancia para *APOC3* -482C>T, \*p<0.05, comparado al genotipo CC.

No se encontró asociación estadística entre el alelo de riesgo T en ninguna de sus posibles apariciones genotípicas TT+CT con un aumento de los TAG, ni asociación con ninguna variable bioquímica o clínica analizada, La cinética del comportamiento de los TAG para cada genotipo de -482 del gen *ApoC<sub>3</sub>* se muestra en la grafica 4



**Grafica 4.** Cinética del metabolismo de los TAG condición basal, 2 horas 4 horas según genotipo CC, CT, TT para la variante -482C>T

Como se visualiza en el grafico los niveles de TAG se comportaron mas aumentados en la población del genotipo portador del alelo de riesgo T con un pico máximo de concentración alcanzado a las 2 horas postprandiales, sin embargo estas diferencias no fueron significativas.

#### **TIPIFICACIÓN DE LA VARIANTE -455 T>C DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE *APOC<sub>3</sub>***

Posteriormente, los productos amplificados fueron digeridos con la enzima de restricción *BtsCI* (PROMEGA), visualizándose en geles de poliacrilamida al 10%, coloreado con nitrato de plata. Donde se generan productos de:

- ✓ Dos bandas 122pb y 72 pb para el genotipo homocigoto T/T

- ✓ Una banda de 194 pb corresponde al genotipo homocigoto C/C.
- ✓ Tres bandas 194 pb, 122 pb, 72 pb para genotipo heterocigoto C/T

En la figura 3 se visualizan los productos de digestión correspondientes a la región -455 T>C del gen *ApoC<sub>3</sub>*.

FIGURA 3

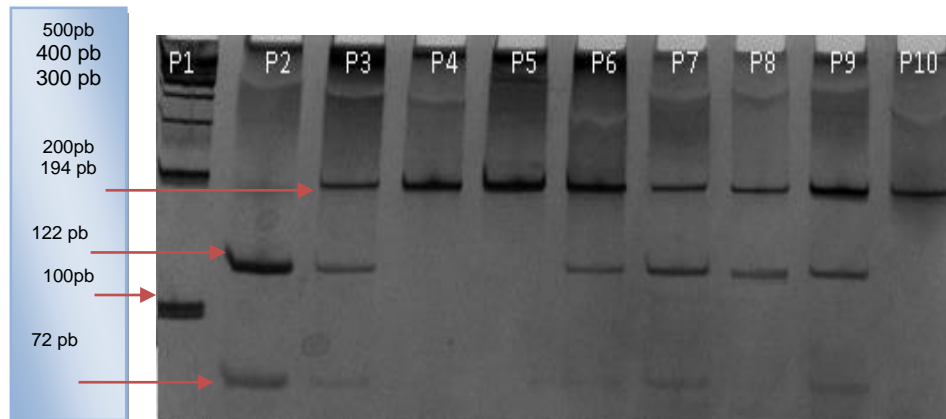


Figura 3. Visualización de los productos obtenidos tras la digestión para la región -455 T>C del gen *ApoC<sub>3</sub>* con la enzima *Btscl*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) en buffer TAE 1X. El carril número 1 corresponde al marcador molecular (MP) de 100 pb (PROMEGA). En el carril 2 genotipo homocigoto para T, carriles 3, 6, 7, 8,9 genotipo heterocigoto para genotipo CT, y carriles 4, 5,10 genotipo homocigoto para C.

### FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO -455 T>C DEL GEN APOC<sub>3</sub>

En el grupo estudiado la distribución genotípica del polimorfismo -482 C>T del gen *ApoC<sub>3</sub>*, está en equilibrio de Hardy Weinberg ( $X^2=2.25981405$  p =0.132770).

Como se observa en la Tabla IV, en los dos grupos de individuos tipificados genotípicamente, se encontró la presencia de los tres posibles genotipos (*CC*, *CT*, *TT*), presentando el genotipo del modelo recesivo *CC*+*TC* la mayor frecuencia 93%, seguido por el genotipo *TT* 7% con frecuencia alélica totales de 69% para el alelo de riesgo C y 31 % para el alelo de silvestre T, en la clasificación según grupo de estudio se observó que el grupo de intolerantes

presento una frecuencia de los genotipos de CC+TC 96%, y el *TT* 4% y una frecuencia alélica de 70% alelo C y 30% alelo T por su parte el grupo de tolerantes presento genotipos de CC+TC en 91%, y el *TT* 9% y una frecuencia alélica de 68% alelo C y 32% alelo T

**Tabla V.** Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -455 T>C del gen *ApoC<sub>3</sub>* en los grupos de estudio.

<b>-455 T&gt;C <i>ApoC<sub>3</sub></i></b>	<b>Tolerantes a los lípidos (n= 127)</b>	<b>Intolerantes a los lípidos (n= 48)</b>	<b>Total (n= 175)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>P</b>
<b>Genotipos</b>					
<b><i>TT</i></b>	9 (11)	4(2)	7 (13)	0,458 (0,097-2,148)	0,15
<b><i>CC+TC</i></b>	91(59)	96(25)	93 (84)	2,181 (0,465-10,222)	0,15
<b>Alelos</b>					
<b><i>T</i></b>	32 (81)	30 (29)	31 (110)	0,924 (0,555-1,538)	0,38 1
<b><i>C</i></b>	68 (173)	70 (67)	69 (240)	1,081 (0,650-1,800)	0,38 1

La agrupación de los genotipos se realizó bajo el modelo de herencia genotípica recesiva que es la que mejor se adapta, este supone que son necesarias 2 copias del alelo C (alelo de riesgo) para modificar el riesgo; por tanto, heterocigotos *TC* y homocigotos del alelo más frecuente *TT* tienen el mismo riesgo. Se compara la combinación de ellos respecto a los homocigotos del alelo variante *CC*<sup>81</sup>

## **ESTUDIO DE RELACIÓN DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS Y CLÍNICAS SEGÚN GENOTIPO PARA LA REGIÓN -455**

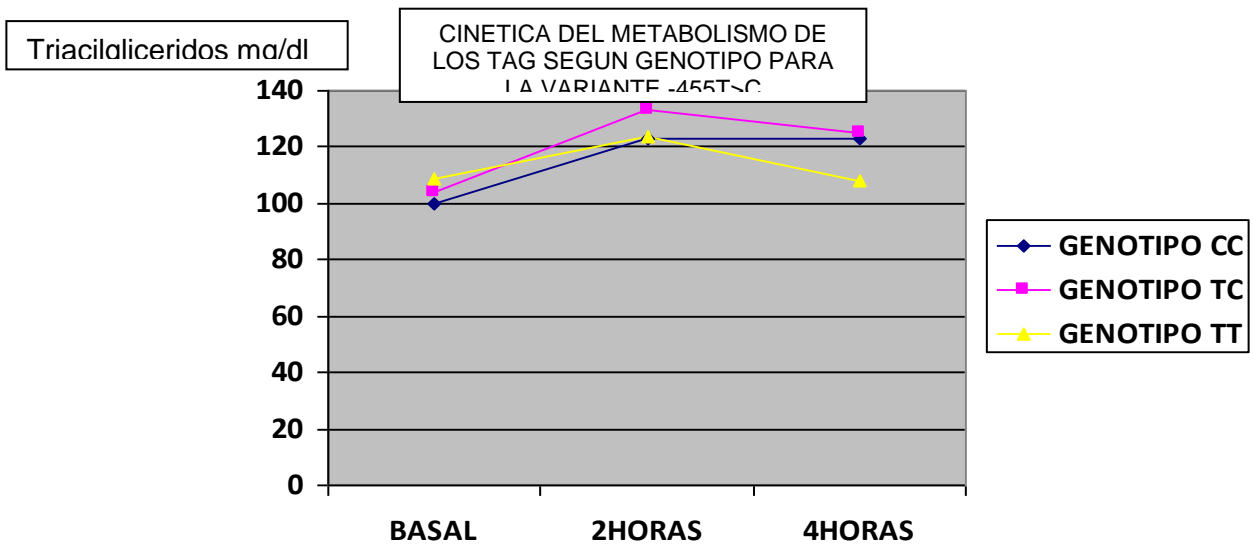
Para conocer las asociaciones entre los parámetros bioquímicos y las variables antropométricas con los genotipos posibles CC, CT, TT se evaluó el estadístico Test de student con un nivel de significación  $\alpha= 0.05$ , tal como se muestra en la tabla VI

**Tabla VI.** Parámetros bioquímicos y clínicos de los individuos del estudio según genotipo para la variante -455 T>C del gen *ApoC<sub>3</sub>*

<b>Parámetros</b>	<b>Genotipo</b>			<b>Valores de Referencia</b>
	<b>CC</b>	<b>TC</b>	<b>TT</b>	
<b>Glucosa mg/dl</b>	88,6±10,3	89,2±8,0	90,8±7,9	70-100
<b>TAG (Basal) mg/dl</b>	100,2±36,3	104,0±36,6	109,4±37,0	30-150
<b>TAG (2h) mg/dl</b>	123,9±47,5	131,4±48,4	124,4±64,8	49-159
<b>TAG (4h) mg/dl</b>	123,1±54,9	125,2±47,6	108,1±55,7	47-159
<b>Colesterol mg/dl</b>	187,0±39,3	182,4±40,0	176,2±46,4	0-200
<b>HDL-C mg/dl</b>	47,4±11,9	47,2±12,3	52,5±13,1	40-60
<b>LDL-C mg/dl</b>	119,5±35,6	114,4±37,2	101,8±38,9	0-159
<b>VLDL-C mg/dl</b>	20,0±7,3	20,8±7,3	21,9±9,4	15-44
<b>Insulina (UI/ml)</b>	10,0±4,6	8,5±3,8	9,6±4,7	5-14
<b>Relación Colesterol/HDLc</b>	4,1±1,2	4,2±2,0	3,5±1,4	<5
<b>Relación LDLc/HDLc</b>	2,7±1,1	2,7±1,7	2,1 ±1,2	<3,6
<b>IMC Kg/M<sup>2</sup></b>	22,4±2,3	23,1±2,5	22,9±1,8	19-24,4
<b>HOMA-IR</b>	2,1±1,2	1,7±1,0	1,8±1,2	<2,5

\*\*Nivel de significancia para *APOC3* -455T>C, \*\*p<0.005 comparado al genotipo TT.

No se encontró correlación estadísticamente significativa para los genotipos CC+CT con los parámetros bioquímicos y clínicos, por lo que no se asocian a niveles de TAG elevados en este estudio. En la grafica 5 se ilustra el comportamiento de los TAG según genotipo para la región -455 gen *ApoC3*.



**Grafica 5.** Cinética del metabolismo de los TAG condición basal, 2 horas 4 horas según genotipo CC, CT, TT para la variante -455T>C

Como se visualiza en el grafico los niveles de TAG se encontraron más aumentados en la población del genotipo TC portador del alelo de riesgo C con un pico máximo a las 2 horas, sin embargo estas diferencias no fueron como significativas.

#### AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIA -1131 DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE *APOA5*

En la figura 4 se observan los productos de amplificación pos-PCR de 154 pb correspondientes a la región -1131 del gen *ApoA5*

FIGURA 4

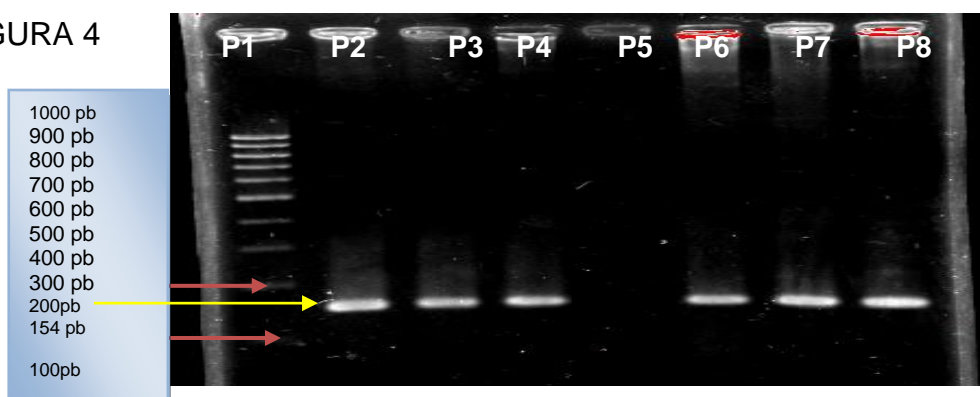


Figura 4. Visualización de los productos amplificados correspondientes a la región del gen *ApoA<sub>5</sub>*, mediante electroforesis en gel de agarosa al (2%) en buffer TBE 1X, coloreado con SYBR®SAFE. El pozo número 1 corresponde al marcador molecular (MP) de 100 pb (PROMEGA). Los carriles 2, 3, 4, 6, 7, 8 corresponden a los productos amplificados (154 pb) y el carril 5 corresponde al control negativo.

### TIPIFICACION DE LA VARIANTE -1131 C>T DE LA REGION PROMOTORA DEL GEN *APOA<sub>5</sub>*

Posteriormente, los productos amplificados fueron digeridos con la enzima de restricción *MseI* (PROMEGA), visualizándose en geles de poliacrilamida al 10%, coloreado con nitrato de plata. De donde se generan productos de:

- ✓ Dos bandas 133 pb y 21 pb para el genotipo homocigoto C/C
- ✓ Una banda de 154 pb para el genotipo T/T, indicando ausencia del sitio de restricción.
- ✓ Tres bandas 154 pb, 133pb, 21 pb para el genotipo heterocigoto C/T.

En la figura 5 se visualizan los productos digestión correspondientes en la región -1135 C>T del gen *ApoA<sub>5</sub>*

**FIGURA 5**

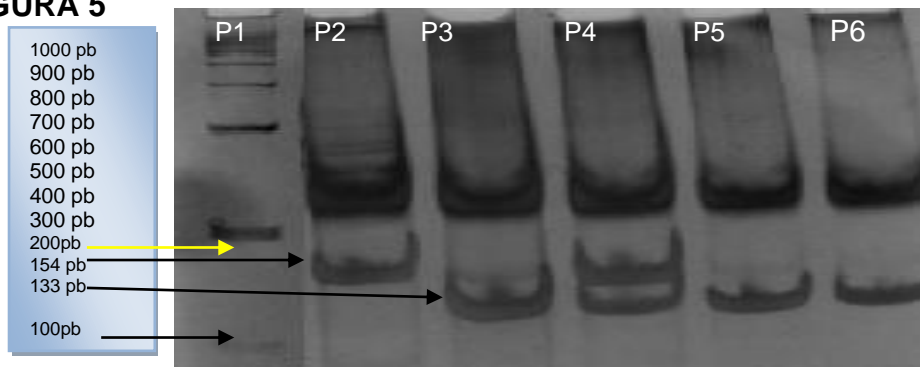


Figura 5. Visualización de los productos obtenidos tras la digestión para la región -1131 T>C del gen *ApoA<sub>5</sub>* con la enzima *MseI*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) en buffer TAE 1X. El carril número 1 corresponde al marcador molecular (MP) de 100 pb (PROMEGA). En el carril 2 genotipo homocigoto para C, carriles 3, 5, 6 genotipo homocigoto para genotipo T, y carril 4 genotipo heterocigoto para CT.

## FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO -1131 T>C DEL GEN APOA<sub>5</sub>

En el grupo estudiado la distribución genotípica del polimorfismo -1131T>C del gen *ApoA<sub>5</sub>*, está en equilibrio de Hardy Weinberg ( $X^2=3.467742441$   $p=0.062577$ ).

Como se observa en la Tabla VII, en los dos grupos de individuos tipificados genotípicamente, se encontró la presencia de los tres posibles genotipos (*CC*, *CT*, *TT*), presentando el genotipo *TT* la mayor frecuencia 55% y el genotipo del modelo aditivo *CC+TC* 45%, con respecto a las frecuencia alélica totales de 75% para el alelo de silvestre T y 25 % para el alelo de riesgo C, en la clasificación según grupo de estudio se observó que el grupo de intolerantes presento una frecuencia de los genotipos de *CC+TC* 65%, y el *TT* 35% y una frecuencia alélica de 38% alelo C y 62% alelo T por su parte el grupo de tolerantes presento genotipos de *CC+TC* en 39%, y el *TT* 61% y una frecuencia alélica de 20% alelo C y 80% alelo T

**Tabla VII.** Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo -1131 T>C del gen *ApoA<sub>5</sub>*.

<u>-1131 T&gt;C</u> <u>ApoA<sub>5</sub></u>	Tolerantes a los lípidos (n= 127)	Intolerantes a los lípidos (n= 48)	Total (n= 175)	<i>P</i>
<b>Genotipos</b>				
<i>TT</i>	61 (78)	35 (17)	(95)	0,0009
<i>CT</i>	38 (48)	54 (26)	55 (74)	0,0009
<i>CC</i>	1 (1)	11 (5)	45(6)	0,0009
<b>Alelos</b>				
<i>T</i>	80(204)	62(60)	75(264)	0,0002
<i>C</i>	20 (50)	38(36)	25(86)	0,0002

La presencia del alelo -1131C está asociado con un riesgo mayor a estar predispuesto a la hipertriacilgliceridemia postprandial, con un OR 2,90 (95% IC: 1,4545-5,7930) en sujetos con genotipo *CT* y OR 5,8 (95% IC: 1,379-6,151) en sujetos con genotipo *CC* con un  $p=0,0002$

## ESTUDIO DE RELACIÓN DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS Y CLÍNICAS SEGÚN GENOTIPO PARA LA REGIÓN -1131

Para conocer las asociaciones entre los parámetros bioquímicos y las variables antropométricas con los genotipos posibles CC, CT, TT se evaluó el estadístico Test de student con un nivel de significación  $\alpha=0.05$ , tal como se muestra en la tabla VIII.

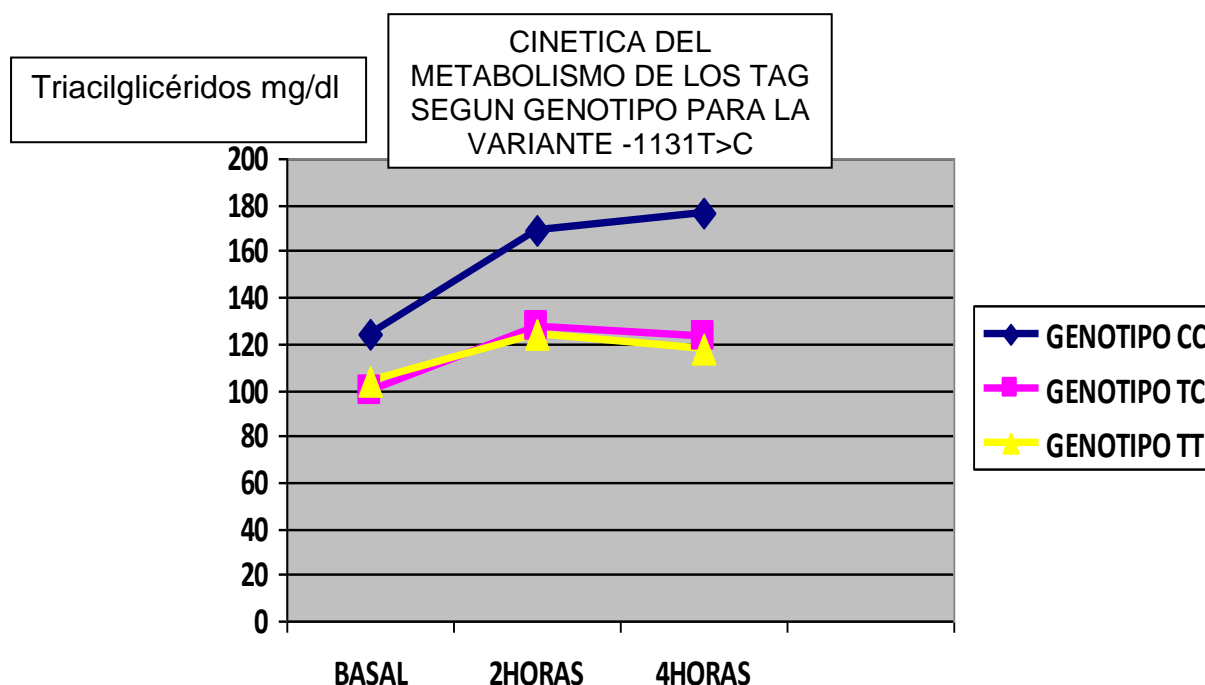
**Tabla VIII.** Parámetros bioquímicos y clínicos de los individuos del estudio según genotipo para la variante -1131 T>C del gen *ApoA<sub>5</sub>*

<b>Parámetros</b>	<b>Genotipo</b>			<b>Valores de Referencia</b>
	<b>CC</b>	<b>TC</b>	<b>TT</b>	
<b>Glucosa mg/dl</b>	92,5±11,2	89,1±9,4	88,8±±8,7	70-100
<b>TAG (Basal) mg/dl</b>	124,5±36,5	99,0±36,4	104,3±37,6	30-150
<b>TAG (2h) mg/dl</b>	169,0±73,4*	127,2±46,3	124,4±46,0	49-159
<b>TAG (4h) mg/dl</b>	176,0±93,0**	123,0±53,0	118,4±43,0	47-159
<b>Colesterol mg/dl</b>	183,0±22,0	184,6±41,2	183,6±40,4	0-200
<b>HDL-C mg/dl</b>	45,3±10,2	46,9±12,6	48,5±12,1	40-60
<b>LDL-C mg/dl</b>	112,8±23,7	117,9±37,9	114,3±36,6	0-159
<b>VLDL-C mg/dl</b>	24,9±7,3	19,8±7,3	20,9±7,5	15-44
<b>Insulina (UI/MI)</b>	14,1±5,8**	8,3±4,0	9,6±4,3	5-14
<b>Colesterol/HDLc</b>	4,2±0,9	4,2±1,6	4,1±1,8	<5
<b>LDLc/HDLc</b>	2,6±0,8	2,8±1,4	2,6±1,5	<3,6
<b>IMC Kg/M<sup>2</sup></b>	22,4±1,8	22,8±2,7	22,8±2,2	19-24,4
<b>HOMA IR</b>	3,3±1,7**	1,8±0,9	2,1±1,0	<2,5

Nivel de significación \*p<0.05 \*\*p<0.005 comparado al genotipo TT

La correlación encontrada para el polimorfismo APOA5 -1131 T>C, resulto ser positiva y estadísticamente significativa con un valor de  $p < 0.05$  entre los individuos homocigotos para la variante alélica C con los niveles de TAG postprandial a las 2h ( $r = 0.167$ ,  $p = 0.013$ ) y significativamente superior para los TAG 4h ( $r = 0.20$ ,  $p = 0.004$ ). De igual manera se encontró para con la Insulina índices de correlación altamente significativos ( $r = 0.22$ ,  $p = 0.002$ ) y con el índice HOMA ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.001$ ) respectivamente. No se encontró relación estadística entre las demás variables analizadas.

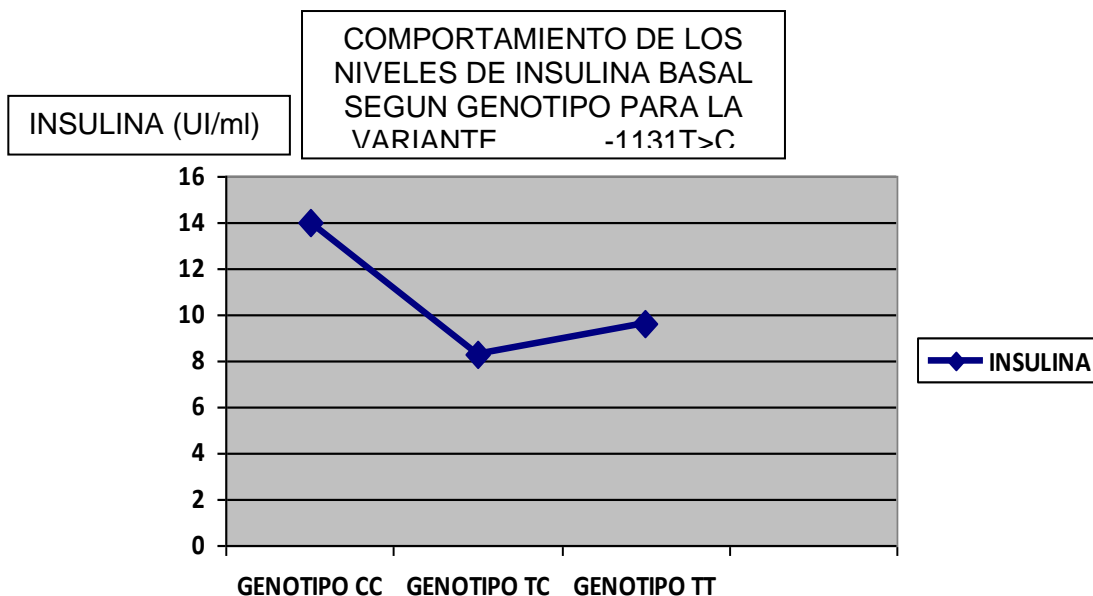
En el grafico 6 se expresa el comportamiento de los TAG por genotipo para las variantes de -1131 gen *ApoA5*.



**Grafica 6.** Cinética del metabolismo de los TAG condición basal, 2 horas 4 horas según genotipo CC, CT, TT para la variante -1131T>C

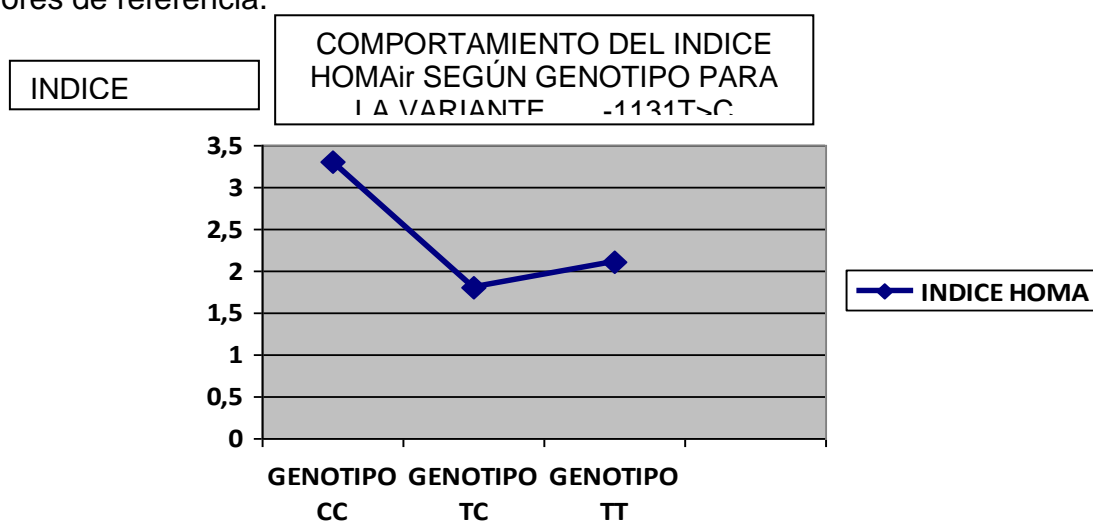
Como se visualiza en el grafico los niveles de TAG se encontraron más aumentados en la población del genotipo CC portador del alelo de riesgo C con pico máximo de concentración a las 4 horas postprandiales, estas diferencias se consideraron con significancia  $p < 0.05$  a las 2 horas y  $p < 0.005$  a las 4 horas postprandiales.

Otro hallazgo fue la correlación positiva entre el alelo de riesgo C y los niveles de insulina basal e índice HOMA, el comportamiento de estas variables según genotipo se muestran en los gráficos 7 y 8 respectivamente.



**Grafica 7.** Comportamiento de los niveles de insulina basal según genotipo CC, CT, TT para la variante -1131T>C

Es posible observar como los individuos portadores del genotipo CC presentan niveles de insulina basal estadísticamente superiores con respecto a los otros genotipos y además la media se encuentra ligeramente por encima de los valores de referencia.



**Grafica 8.** Comportamiento del Índice HOMA<sub>air</sub> según genotipo CC, CT, TT para la variante -1131T>C

En este grafico se evidencia que los individuos portadores del genotipo CC presentan un índice HOMA-IR estadísticamente superiores con respecto a los otros genotipos y además la media de este valor para este grupo de individuos se encuentra por encima de los valores de referencia.

## **B. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

El riesgo cardiovascular ha sido un importante tópico evaluado en pacientes con hipertriacilgliceridemia. Los estudios que asocian la caracterización de polimorfismos del gen de la *ApoC<sub>3</sub>* y *ApoA<sub>5</sub>* y los niveles de triacilglicéridos tienen resultados controversiales, ya que las posibles asociaciones con mecanismos de expresión genética aún se consideran poco dilucidados.

En el presente trabajo se pretende comprender con datos locales, los mecanismos fisiopatológicos y su impacto sobre metabolismo lipídico y el riesgo cardiovascular en individuos normolipémicos; para ello se propuso describir la posible asociación entre las variantes -482 C>T, -455 T>C del gen *ApoC<sub>3</sub>* y -1131 T>C del gen *ApoA<sub>5</sub>* con los niveles plasmáticos de Triacilglicéridos (TAG) en estado postprandial. Aun no quedan claros cuales son las rutas que vinculan los polimorfismos del gen *ApoC<sub>3</sub>* o *ApoA<sub>5</sub>* con marcadores no tradicionales de riesgo cardiovascular, sin embargo, estas apoproteínas por ser parte de las lipoproteínas ricas de triacilglicéridos (PRT) podrían tener un rol importante en el metabolismo de los lípidos en individuos normolipémicos en ayunas, llevándolos a presentar hipertrigliceridemia postprandial.

En este estudio se efectuaron registros en 175 individuos que cumplieron con los criterios de inclusión, a los cuales se midieron variables bioquímicas y clínicas: glucosa, colesterol y triacilglicéridos basal e IMC. A todos los individuos se les realizó la prueba de tolerancia oral a las grasas clasificando la muestra (n:175) en dos grupos tolerantes 73% e intolerantes a las grasas 27%.

Entre las características de los individuos analizados predominó el sexo femenino en el 61 % de la muestra, asimismo no se encontraron diferencias significativas para las variables sexo, edad e IMC (ver tabla I).

Se observó diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) entre los grupos para las variables Glucosa, HDLc, VLDc, TAG basal, 2Horas y 4 Horas; estos resultados reflejan la tendencia que tienen los individuos intolerantes a las grasas en presentar un perfil lipídico aterogénico, quienes a pesar de no presentar dislipidemia aterogénica(DA), según criterios Asociación Latinoamericana para estudio de los lípidos (ALALIP), ni alteraciones metabólicas según ATP III<sup>81</sup>, pudieran tener diferencias entre polimorfismos de los genes de la *ApoC3* y *ApoA5*, asociados a posibles cambios epigenéticos.

En este orden de ideas se han reportado casos de asociación directa entre los niveles plasmáticos de ApoC<sub>3</sub> aumentados  $>15\text{mg/dl}$  y un aumento de TAG circulantes<sup>81,67</sup>, los mecanismos propuestos para explicar este evento se basan según diversos autores en una acción inhibitoria que ejerce la apolipoproteína C<sub>3</sub> sobre la enzima Lipoprotein Lipasa (LPL)<sup>8,28,29,67,82,83,84</sup>.

Recientemente estudios se han descrito efectos Pro-aterogénicos de la ApoC<sub>3</sub> independiente a los niveles de TAG<sup>84,85,86,87</sup>, este hecho resulta interesante porque si bien los marcadores aterogénico rutinarios han permitido evaluar y dar seguimiento a pacientes en alto riesgo de padecer ECV, aquellos individuos que manejan estados normolipémicos y niveles de ApoC<sub>3</sub> aumentados presentan riesgo aterogénico subclínico.

Sin embargo, las razones que expliquen el aumento de dichas concentraciones de ApoC<sub>3</sub> es un tópico que si bien se relaciona abre otro mundo de investigaciones, y es donde este trabajo propuso a las variantes genéticas conocidas como Elementos de Respuesta a la Insulina (ERI) -482 C>T y -455 T>C del gen *ApoC<sub>3</sub>* como causales de aumentos de TAG.

Las posibles razones que hasta el momento estudios han avalado para explicar los niveles de ApoC<sub>3</sub> aumentados en poblaciones que presentan los polimorfismos ERI se basan en que el gen de *ApoC<sub>3</sub>* sufre down regulation por los niveles de insulina sólo en aquellos genes que llevan el promotor de

tipo salvaje, pero no en los genomas que contienen las variantes C482 + T y T455 + C<sup>69,88</sup>, la presencia de un alelo raro de cualquier variante (-455C o -482-T) es suficiente para eliminar la capacidad de la insulina para inhibir la expresión de apoC<sub>3</sub> *in vitro*<sup>64</sup>. Es decir la insulina no es capaz de ejercer su presunto efecto represor sobre la expresión y síntesis de apolipoproteína C<sub>3</sub>, estos hallazgos explicarían aumentos plasmáticos en los niveles de ApoC<sub>3</sub> que se traducirían en estados de Hipertriacilgliceridemia y que se espera se acentúen en estado Postprandial.

En este sentido tras la evaluación de la genotipificación del polimorfismo -482C>T se empleó el modelo dominante, este supone que una única copia de T (alelo de riesgo) es suficiente para modificar el riesgo y que ser portador de 2 copias lo modifica en igual magnitud; es decir, heterocigotos *TC* y homocigotos *TT* tienen el mismo riesgo asociado<sup>81</sup>. En nuestro estudio los portadores del genotipo *TT* o *CT* presentaron un aumento estadísticamente significativo  $p < 0,0098$  en el grupo de intolerantes en comparación al grupo control con OR: 2,792 (IC95%: 1,154-6,756) lo que significa que la población portadora de los genotipos *TT* o *CT* poseen 2,7 veces más predisposición a ser intolerante a las grasas que los portadores del genotipo *CC*, los cuales pudieran alcanzar niveles de TAG postprandiales por encima de los valores establecidos como normales o lo que es decir estados de Hipertriacilgliceridemia postprandial, caso contrario a los portadores del genotipo *CC* que presenta un OR 0,358 (IC95%: 0,148-0.866) que se podría traducir como un genotipo con efecto protector a presentar intolerancia a las grasas.

Al examinar la frecuencia genotípica; se evidenció que el 56% de individuos intolerantes presentaron el alelo de riesgo T, con 85% para el genotipo *CT+TT*, y el alelo salvaje C se encontró en 44% con el genotipo *CC* en 15% en la misma población. Al correlacionar niveles de TAG con el alelo T en sus genotipos *TT* o *CT* no se encontró asociación (grafica 4), del mismo modo que con ninguna variable bioquímica o clínica medida (Tabla III, Tabla IV). Dwan M y col realizaron un estudio de prueba de tolerancia a los lípidos y a la glucosa donde encontraron relación directa entre el polimorfismo -482 C>T y los niveles Glucosa e insulina, mas no encontraron asociación con estados de

hipertriacilgliceridemia lo que se puede comparar con los resultados obtenidos en este trabajo, aunque en nuestro estudio tampoco se encontró asociación entre los niveles de glucosa o insulina basal, es recomendable evaluar los niveles postprandiales de los mismos antes de dar por sentado que no existe una posible relación. Otros estudios han propuesto estados de hipertriacilgliceridemia con esta variante del gen *ApoC<sub>3</sub>* como es el caso de Whaterwoorth<sup>85</sup> y col en una población fumadora, mismos resultados se han reportado en diversas poblaciones con síndrome metabólico y pacientes con Resistencia a la Insulina<sup>11.12.13.14,69</sup>.

En el análisis del polimorfismo -455T>C el modelo recesivo *CC+CT* se encontró con aumento en el grupo de intolerantes en comparación al grupo control con  $p=0,15$  y OR: 2,181 (IC95%: 0,465-10,222) lo que significa si bien no resulto en una diferencia estadísticamente significativa la población portadora del genotipo *CC* o *CT* pareciera presentar una predisposición genética a ser intolerante a las grasas con posibles estados de Hipertriacilgliceridemia postprandial, caso contrario a los portadores del genotipo *TT* que presenta un OR 0,458 (IC95%: 0,097-2,148) y se podría traducir como un efecto protector a presentar intolerancia a las grasas.

Con respecto a la frecuencia genotípica, se evidenció que el 70% de individuos intolerantes presentaron el alelo de riesgo C, con 94% para el genotipo *CC+TC*, y el alelo salvaje T se encontró en 30% con el genotipo *TT* en 4% en la misma población. Al correlacionar niveles de TAG con el alelo C en sus genotipos *CC* o *CT* no se encontró asociación, del mismo modo que con ninguna variable bioquímicas o clínica medida (Tabla V, Tabla VI). Estos hallazgos son con concordantes a lo observado por Klein y cols<sup>89</sup>, quienes no encontraron asociación entre el polimorfismo -455T>C con niveles alterados de TAG en una población de pacientes con Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), el mismo hallazgo fue reportado en sujetos no diabeticos.<sup>90,91,92</sup> en contraposición existen estudios que revelan una relación directa entre dicho polimorfismo con estados de hipertriacilgliceridemia<sup>78,90,91</sup>, pero es necesario mencionar que las poblaciones analizadas en estos estudios no eran considerados como aparentemente sanos, por lo que no se descartan factores predisponentes no mencionados.

Del mismo modo con respecto a la Apolipoproteína A<sub>5</sub> estudios han asociado niveles plasmáticos disminuidos de apoA<sub>5</sub> menos de 24 µg/l<sup>93</sup> con aumento circulante de los TAG<sup>68,69 70,71,72</sup> a través de un mecanismo que supone una participación activadora de la LPL por parte de la ApoA<sub>5</sub> facilitando la interacción de las PRT con la enzima con la consecuente estimulación de la lipólisis de TAG y concomitante reducción de sus valores<sup>92</sup>.

Se propuso en este trabajo que el polimorfismo -1131 T>C se asocia a niveles aumentados de TAG y se presume sea por acción indirecta de niveles bajos de ApoA<sub>5</sub> debido a una baja expresión del gen por defectos genéticos en el proceso de transcripción del gen.

La presencia del alelo -1131C está asociado con un riesgo mayor a estar predispuesto a la hipertriacilgliceridemia postprandial, con un OR 2,90 (95% IC: 1,4545-5,7930) en sujetos con genotipo *CT* y OR 5,8 (95% IC: 1,379-6,151) en sujetos con genotipo *CC* con un  $p=0,0002$ , mientras que los homocigotos *TT* presentan un OR 0,068 (95% IC: 0,007-0,600) con un  $p=0,0002$  presentan un riesgo bajo, lo que es considerado un alelo protector.

Al analizar los parámetros bioquímicos (tabla N°1) de los sujetos incluidos en este estudio, se encontraron concentraciones séricas de glucosa ( $p<0.05$ ), TAG basal, postprandial 2h y 4h, Col/HDL, TAG/HDL ( $p<0.0001$ ) y LDL/HDL ( $p<0.005$ ) significativamente más elevadas en el grupo intolerante al ser comparadas con el grupo tolerante. Por otra parte, los valores de HDL-c ( $p<0.0001$ ) fueron significativamente más bajos en los pacientes intolerantes, resultados igualmente reportados por Saavedra y col<sup>99</sup>.

La correlación encontrada para el polimorfismo -1131 T>C del gen *ApoA5*, resulto ser positiva y estadísticamente significativa con un valor de  $p<0.05$  entre los individuos homocigotos para la variante alélica C con los niveles de triacilglicéridos postprandial a las 2h ( $r= 0.167$ ,  $p=0.013$ ) y significativamente superior para los TAG 4h ( $r= 0.20$ ,  $p=0.004$ ) (tabla VI). Como lo reportado por Lui H y col<sup>97</sup> en una población china con enfermedad coronaria, otros estudios que también han encontrado asociación directa entre TAG y el polimorfismo<sup>74,76,98</sup> en poblaciones diversas. En contraposición

Prochaska y col que no encontraron asociación en pacientes con DMT2 y pacientes con enfermedad arterial coronaria entre -1131 T>C y TAG.

El alelo mutado -1131C presenta un OR 2,448 (95% IC: 1,461-4,101);  $p=0,0002$  comprueba que existe una asociación directa entre la variante del gen *ApoA5* y los niveles de TAG postprandial 2h y 4h.

Si bien no se sabe con certeza la función específica de la apolipoproteína A5, sí se sabe que está fuertemente asociada al metabolismo lipídico, especialmente de los TAG, pues se ha detectado en VLDL, HDL y quilomicrones y su síntesis es a nivel hepática. Es importante destacar que la alteración de la concentración de estas lipoproteínas también se relaciona con ECV.

Recientemente se ha desarrollado el primer método para la determinación de la concentración de ApoA5, puesto que sus valores plasmáticos son significativamente inferiores a los de las otras apolipoproteínas, como la ApoA4<sup>94</sup>.

Las concentraciones plasmáticas de la ApoA5 varían entre 24 y 406  $\mu\text{g/l}$ , mientras que la ApoC3 circula en el plasma a concentraciones 400 veces mayores que la ApoA5<sup>95</sup>. La relación entre los valores de ApoA5 y los de TAG también se ha descrito en un estudio de investigación clínica en personas sanas de la población china donde se ha observado que las concentraciones de ApoA5 guardan una relación negativa con los valores de TAG y positiva con los del colesterol unido a HDL (cHDL)<sup>96</sup>.

El mecanismo exacto por el cual la ApoA5 influye en las concentraciones de TAG todavía no está claro. Se ha señalado que la ApoA5 participa en la hidrólisis de VLDL, en la captación de lipoproteínas remanentes<sup>97</sup> y en la disminución de la síntesis y liberación de VLDL<sup>98</sup>.

La ausencia de ApoA5 en ratones genéticamente modificados indujo una disminución de la lipólisis de PRT y de la eliminación de sus remanentes<sup>97</sup>, datos que pueden evidenciar su participación en estos procesos metabólicos.

Un estudio sobre la capacidad de unión de la heparina con la ApoA5 indica que ésta facilita la interacción de lipoproteínas ricas en TAG proteoglicanos, posiblemente contribuyendo a la interacción entre la lipoproteinlipasa (LPL) y las lipoproteínas ricas en TAG con la consecuente estimulación de la lipólisis de TAG y concomitante reducción de sus valores<sup>98</sup>.

Es por estas bases, que el presente trabajo se planteó el objetivo de determinar si el aumento de los TAG postprandiales está asociado al polimorfismo del gen *ApoA5*, de esta manera estimar el riesgo que tiene la población aparentemente sana de padecer ECV.

Por lo tanto, si se cree que el mecanismo por el cual interviene la ApoA5 es mediado por un aumento en la actividad de la LPL, incrementando la lipólisis de las VLDL y así disminuir la concentración de TAG, entonces la expresión del polimorfismo en este gen puede producir el efecto contrario al mencionado, generando estados de hipertriacilgliceridemia postprandial, debido a que la presencia del alelo mutado se ha asociado a una disminución en la expresión del gen, condicionando esto a un aumento de TAG con mayor predisposición a ECV.

De igual forma se encontró para con la Insulina índices de correlación altamente significativos ( $r= 0.22$ ,  $p=0.002$ ) y con el índice HOMA ( $r= 0.23$   $p=0.001$ ) respectivamente (tabla VII).

Resultando que individuos con el genotipo CC presentan concentraciones mayores de insulina ( $14.1\pm 5.8$  UI/mL) con un nivel de significancia  $p<0.005$  comparado al genotipo TT silvestre, lo que podría asociarse a una disminución en la sensibilidad de la unión de la insulina a su receptor, que lleva a generar un incremento en sus concentraciones plasmáticas con el fin de mantener la homeostasis. Un nivel aumentado de insulina está relacionado con resistencia a la misma y es considerado un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión arterial y la cardiopatía isquémica o bien para desarrollar diabetes mellitus.

Lo mismo ocurre con el índice HOMA donde obtuvimos resultados mayores ( $3.3 \pm 1.7$ ) en aquellos sujetos con genotipo *CC*, con un nivel de significancia  $p < 0.005$  comparado al genotipo *TT*.

Estos datos son relevantes debido a que al momento de la evaluación inicial de los grupos tolerantes e intolerantes no se evidenció ninguna diferencia significativa para estos parámetros (insulina y HOMA), pero al realizar la correlación con los genotipos se evidencia que si hay diferencia significativa y una correlación positiva entre las variantes insulina y HOMA para el genotipo *CC*, además estos parámetros se encuentran con una tendencia hacia el límite superior, esto aunado a los niveles de TAG aumentados en estado postprandial se podrían traducir como un estado potencial de insulino resistencia.

Estos hallazgos son considerado un factor de riesgo para la formación de placas de aterosclerosis, y eventual ECV, como lo sugiere Saavedra<sup>99</sup> quien concluye que la asociación observada entre las variantes genéticas de *ApoA5* y las altas concentraciones séricas de TAG y glucosa, en grupos de pacientes con enfermedad coronaria (EC) lo que sugiere que este polimorfismo podría contribuir al desarrollo de la dislipidemia, un reconocido factor de riesgo para ECV<sup>99</sup>. de igual modo los autores asociaron las variantes de *ApoA5* con niveles significativamente más elevados de Glucosa basal, si bien estos resultados no fueron encontrados en nuestra población proponen de igual modo un posible estado de resistencia a la insulina en ese muestreo de la población chilena.

Si definimos la resistencia a la insulina (RI) como una reducida respuesta fisiológica de los tejidos a la acción de la insulina, con una consecuente hiperinsulinemia compensatoria, que inicialmente mantiene los niveles plasmáticos de glucosa dentro de rangos normales<sup>100</sup>, podemos entonces observar que los sujetos portadores del genotipo *CC* para el gen *ApoA5* evidencian un riesgo mayor de hiperinsulinemia, en comparación con los sujetos portadores el genotipo *TT*, aunado a esto encontramos que el índice HOMA el cual estima la homeostasis basal mediante las concentraciones en ayunas de la glucosa y la insulina, a través de una fórmula bien validada y establecida ha demostrado ser un buen equivalente para estimar la RI<sup>100</sup>; siendo dicho índice mucho mayor en sujetos con genotipo *CC*, existiendo por

tanto un importante factor de riesgo de diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular.

Finalizando se puede resumir que de igual manera a como se ha venido reportando en diversos estudios con alto grado de impacto en investigación clínica existen controversias y resultados contradictorios entre las asociaciones de las expresiones genéticas y las variables bioquímicas de interés. Existen diversas razones que pueden explicar estas discrepancias, entre éstas podemos mencionar: el diseño del estudio, la definición de los criterios de inclusión y exclusión, el número de individuos, y por supuesto la etnia de los sujetos evaluados.

Se planteo como parte de los objetivos del presente estudio evidenciar la posible relación entre indicadores aterogénicos como herramientas para evaluar el riesgo cardiovascular a manera de screening en la población y los polimorfismos estudiados. Para ello se evaluó en los subgrupos de la muestra de este estudio el índice de Castelli y la relación LDLc/HDLc; observándose diferencia significativa para el índice Colesterol Total/HDLc  $p < 0,0001$  y el indicador LDLc/HDLc  $p < 0,05$ , en el grupo de intolerantes con respecto al grupo control.

Se procedió a realizar el análisis del Riesgo Relativo (RR) para los grupos donde el índice Colesterol total/HDLc  $> 5$  presento un RR= 3.074(IC95% 1.886-4.579) lo que propone que la población intolerante presenta un riesgo 3 veces mayor a sufrir eventos cardiovascular con respecto a la población tolerante con  $p < 0.0001$ , Cuando el índice de Castelli(Colesterol total/HDLc) se encuentra  $< 5,0$  indica que la concentración de HDL es suficiente para cumplir adecuadamente el transporte del colesterol hacia el hígado, mientras que cuando esta relación está por encima de 5 implica que el total de colesterol no puede ser removido completamente de manera efectiva por acción de la lipoproteína HDL y podría depositarse en la pared de los vasos sanguíneos en forma de LDL altamente aterogénica<sup>34</sup>.

Lo que indicaría para los resultados obtenidos en este estudio como se observa en la tabla II y gráfico 3, que los individuos intolerantes presentan

mayor riesgo de aterosclerosis al tener los valores para los índices significativamente mayores que el grupo tolerantes y además los mismos son mayores al punto de corte establecido como normal

Con respecto al indicador  $LDLc/HDLc > 3,6$  se obtuvo un  $RR = 2.417$  ( $IC_{95\%} 1.418-3.713$ ) por lo que la población intolerante presentara 2,4 veces más riesgo de padecer un evento cardiovascular (tabla II) debido a un desplazamiento en el equilibrio a favor de la lipoproteína aterogénica LDLc por lo que el exceso de colesterol que no puede ser removido eficientemente por las HDL y se estaría depositado en la íntima de la pared arterial, contribuyendo así a la formación del ateroma<sup>7</sup>

Los resultados encontrados para los indicadores aterogénicos resulta un hallazgo muy importante ya que estos individuos se catalogaron como normolipemicos en estado basal y sin evidencias clínicas de alguna condición especial por lo que se llamaron aparentemente sanos pero que en estado postprandial y con intolerancia a las grasas se evidencian aumentos en el riesgo a ECV de igual manera fue reportado por Paglion, A y col<sup>101</sup>.

Al evaluar los indicadores de riesgo cardiovascular con los polimorfismos genéticos -482 C>T y -455 T>C del gen *apoC<sub>3</sub>* y -1131 T>C del gen *apoA<sub>5</sub>* se encontró que no existió correlación significativa entre estas variables y los genotipos posibles de los polimorfismos mencionados (tablas VI I, VI, VIII), por lo que el estado de riesgo encontrado en el grupo de intolerantes no puede concluirse sea asociado al riesgo genético evaluado, sino tal vez a variabilidades metabólicas, de calidad nutricional o de de hábitos de sedentarismo, claros desencadenantes de ECV<sup>48</sup>.

### **C. CONCLUSIONES**

- La muestra de estudio se encontró en Equilibrio Hardy-Weinberg.
- Los individuos intolerantes a las grasas presentaron niveles de glucosa, VLDLc, TAG basal, TAG 2 horas, TAG 4horas significativamente mayores y menores de HDLc que respecto al grupo tolerante.

- Los individuos intolerantes a la carga lipídica presentaron índices aterogénicos significativamente mayores.
- Los genotipos TT+CT del polimorfismo -482 C>T presentan 2,7 veces más riesgo a padecer intolerancia a las grasas con o sin estados de hipertriacilgliceridemia Postprandial.
- El genotipo CC del polimorfismo -482 C>T confiere un efecto protector a presentar intolerancia a las grasas.
- No se encontró asociación entre el polimorfismo -482 C>T y los niveles de TAG basal, 2 ó 4 horas.
- Los genotipos CC+TC del polimorfismo -455 T>C parecieran estar asociado con 2,2 veces más riesgo a padecer intolerancia a las grasas con o sin estados de hipertriacilgliceridemia Postprandial sin embargo en este estudio no se encontró diferencia significativa entre los grupos del estudio.
- El genotipo TT del polimorfismo -455 T>C confiere un efecto protector a presentar intolerancia a las grasas.
- No se encontró asociación entre el polimorfismo -455 T>C y los niveles de TAG basal, 2 ó 4 horas.
- Los genotipos CC+TC del polimorfismo -1131 T>C presentan 14,6 veces más riesgo a padecer intolerancia a las grasas con o sin estados de hipertriacilgliceridemia Postprandial.
- El genotipo TT del polimorfismo -1131 T>C confiere un efecto protector a presentar intolerancia a las grasas.
- El polimorfismo -1131C se encontró asociado con regresión positiva a los niveles de TAG a las 2 y 4 horas, los niveles de insulina basal y el índice HOMA.
- No se encontró asociación entre los alelos de riesgo para los polimorfismos estudiados y los indicadores aterogénicos.

#### **D. RECOMENDACIONES**

- ✓ Realizar la medición de los niveles plasmático de Apolipoproteina C<sub>3</sub> y Apolipoproteina A<sub>5</sub> con el fin de dilucidar la posible triada de asociación entre las variables “alelo de riesgo- niveles aumentados de Apoc3 o disminuidos de ApoA<sub>5</sub>- estados de Hipertriacilgliceridemia”
- ✓ Realizar mediciones postprandiales a los niveles de glucosa e insulina para evidenciar o no la asociación con los alelos de riesgo para los polimorfismos -482C>T y -455 T>C y posible estado de RI encontrado en asociación con el genotipo CC del polimorfismo -1131T>C

## REFERENCIAS

1. OMS. Enfermedades Cardiovasculares. Temas de Salud. [citado 15 Enero de 2017]. Disponible en: [http://www.who.int/topics/cardiovascular\\_diseases/es](http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/es)>.
2. OMS. Enfermedades Cardiovasculares. [citado 15 Enero de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>.
3. Pérez C, Maceira J, Rodríguez A, Herrera L. Caracterización de los pacientes con enfermedad cerebrovascular. Revista Vinculando. [Revista en la Internet]. Enero 2010. [citado 18 Enero 2017], Disponible en: <http://vinculando.org>
4. Nordestgaard B, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting Triglycerides and Risk of Myocardial Infarction, Ischemic Heart Disease, and Death in Men and Women. *Jama* 2007;298:299-308. [Consultado el 14 de Enero de 2017]. Disponible en <http://jama.ama-assn.org/content/298/3/299.full.pdf+html?sid=c004e018-4534-43a9-8faa-f43b6b32951d>
5. Garcés M<sup>a</sup> Fatima, Stekman H, Bisarini A, Briceño R. Triglicéridos posprandial y su relación con las enfermedades cardiovasculares. *Acta Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec.* 2009;12(1);111-121.
6. JUAN DE DIOS GARCÍA DÍAZ CAPÍTULO III Hipertriglicéridemias primarias Unidad de Lípidos. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Madrid [Consultado el 18 de Enero de 2017]. Disponible en [https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/publicaciones/capitulo-3\\_3.pdf](https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/publicaciones/capitulo-3_3.pdf)
7. Garcés Ma Fatima, Stekman H, Guarín Y, Carrero Y, Hernández C, Rivas A, Núñez Triglicéridos postprandiales: importancia ¿Cuándo medirlos? *Acta Cientif de la Soc Venez de Bioanal Espec* 2014;12(1)111-121
8. Dammerman M, Sandkuult L, Halaas J, Chung W and Breslow J. An apolipoprotein CIII. haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc Nat Acad Sci* 1993;90:4562-4566.
9. Maeda N, Li H, Lee D, Oliver P, Quarfordt SH, Osada J. Targeted disruption of the apolipoprotein CIII gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J Biol Chem* 1994;269(38):23610-23616.
10. Waterworth D, Ribalta J, Nicaud V, Dallongeville J, Humphries S y Talmud P. ApoC111 Gene Variants Modulate Postprandial Response to Both Glucose and Fat Tolerance Tests. *Circul Amer Heart Assoc* 1999;99:1872-1877.
11. Miller M, Rhyne J, Chen H, Beach V, Ericson R, Luthra K, y col. APOC3 Promoter Polymorphisms C-482T and T-455C Are Associated with the Metabolic Syndrome. *Arch Med Res* 2007;38:444-451.
12. Dorfmeister B, Cooper J, Stephens J, Ireland H, Hurel S, Steve E. The effect of APOA5 and APOC3 variants on lipid parameters in European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbeans with type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:355-363.

13. Florez H, Casanova P, Mendez A, Larreal C, Castillo S y cols. Increased apolipoprotein C-III levels associated with insulin resistance contribute to dyslipidemia in normoglycemic and diabetic subjects from a triethnic population *Atheroscler* 2006;188:134-141.
14. Onat A, Unaltuna N, Coban N, C;ik;ekG y YOksel H, APOC3 482C/T polymorphism, circulating apolipoprotein C-III and smoking: Interrelation and roles in predicting type-2 diabetes and coronary disease. *Clin Biochem* 2011;44(5-6):391-396.
15. Taies, Ordovas JM. Clinical significance of apolipoprotein A5. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:349-354.
16. Chien KL, Fang WH, Wen HC, Lin HP, Lin YL, Lin SW, et al. APOA1/C3/A5 haplotype and risk of hypertriglyceridemia in Taiwanese. *Clin Chim Acta* 2008; 390:56-62.
17. Moreno R, Perez-Jimenez F, Marin C, Moreno JA, Gómez P, Bellido C, et al. A single nucleotide polymorphism of the apolipoprotein A-V gene -1131T>C modulates postprandial lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis* 2006;189:163-168
18. Rensen PC, van Dijk KW, Havekes LM. Apolipoprotein AV: low concentration, high impact. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2445-7.
19. Yan SK, Cheng XQ, Song YH, Xiao XH, Bi N, Chen BS. Apolipoprotein A5 gene polymorphism -1131T -> C association with plasma lipids and type 2 diabetes mellitus with coronary heart disease in Chinese. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(6):607-612.
20. Meaney E, Rivera J, Shuchleib R, Gomez E. Programa de actualización continua para cardiología aterosclerosis y sus precursores. México distrito federal. 1998 FALTA EDITORIAL
21. Van Der Vliet H, Schaap F, Levels J, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling J, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:1156-1159
22. Fruchart-Najib J, Bauge E, Niculescu L, Pham T, Thomas B, Rommens C, et al. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:397-404
23. Merkel M, Heeren J. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis. *J Clin Invest* 2005;115:2694-2696.
24. Austin MA, Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991;11:2-14 [Consultado el 30 de enero de 2017]. Disponible en <http://atvb.ahajournals.org/content/11/1/2>
25. Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation.* 1979;60:473-485.

26. Ridker PM. Fasting versus Nonfasting Triglycerides and the Prediction of Cardiovascular Risk: Do We Need to Revisit the Oral Triglyceride Tolerance Test? *Clinical Chemistry* 2008;54:11-13.
27. Russell Warnick G, Nakajima K. Fasting versus Nonfasting Triglycerides: Implications for Laboratory Measurements. *Clinical Chemistry* 2008;54:114–116.
28. Brown W, Baginsky M. Inhibition of lipoprotein lipase by an apolipoprotein of human very low density lipoprotein *Biochim Biophys Res Com* 1972;46:376-382
29. Waterworth D, Ribalta J, Nicaud V, Dallongeville J, Humphries S y Talmud P. ApoC111 Gene Variants Modulate Postprandial Response to Both Glucose and Fat Tolerance Tests. *Circul Amer Heart Assoc* 1999;99:1872-1877.
30. Komurcu-Bayrak E, Onat A, Poda M, Humphries SE, Palmen J, Guclu F, et al. Gender-modulated impact of apolipoprotein A5 gene (APOA5) -1131T>C and c.56C>G polymorphisms on lipids, dyslipidemia and metabolic syndrome in Turkish adults. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:778-784.
31. Olano-Martin E, Abraham EC, Gill-Garrison R, Valdes AM, Grimaldi K, Tang F, et al. Influence of apoAV gene variants on postprandial triglyceride metabolism: impact of gender. *J Lipid Res* 2008;49:945-953.
32. Vaessen SF, Schaap FG, Kuivenhoven JA, Groen AK, Hutten BA, Boekholdt SM, et al. Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. *J Lipid Res* 2006;47:2064-2070.
33. Martinelli N, Trabetti E, Bassi A, Girelli D, Friso S, Pizzolo F, et al. The -1131 T>C and S19W APOA5 gene polymorphisms are associated with high levels of triglycerides and apolipoprotein C-III, but not with coronary artery disease: an angiographic study. *Atherosclerosis* 2007;191:409-417.
34. Bansal S, Buring J, Rifai N, Mora S, Sacks F, Ridker P. Fasting Compared With Nonfasting Triglycerides and Risk of Cardiovascular Events in Women. *Jama* 2007;298:309-316. [Consultado el 02 de febrero 2017]. Disponible en <http://jama.ama-assn.org/content/298/3/309.full.pdf+html?sid=c004e018-4534-43a9-8faa-f43b6b32951d>
35. Garmendia F, Pando R, Torres W, Valqui W, Jamieson C, Blufstein N. Metabolismo postprandial en adultos mayores y normales de nivel del mar. *Anales de la Facultad de Medicina* 2003;64(3) [Consultado el 30 de enero de 2017]. Disponible en [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v64\\_n2/metabolismo.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/anales/v64_n2/metabolismo.htm)
36. Navarro V, Zabala A, Gómez S, Portillo M. Metabolismo del colesterol: bases actualizadas. *Revista Española de Obesidad [Revista en línea]* 2003;7(6):360-384. [Consultado el 02 de Febrero de 2017]; Disponible en <http://www.seedo.es/portals/seedo/RevistaObesidad/2009-n6-Revision-Metabolismo-del-colesterol-bases-actualizadas.pdf>
37. Kwiterovich PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol* 2000;86(Suppl):L5-

10. [Consultado el 02 de febrero de 2017] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11374859>
38. Bioquímica y biología [Consultado el 02 de febrero de 2017] disponible en <http://www2.uh.es/mapa/seminarios/activos/Biol%20Sanitaria/Temas%2022,%2023/Lipoproteinas/imagenes/transporte%20lipop2>.
39. Miller M, Stone N, Ballantyne C, Bittner V, Criqui M, Kris-Etherton P, et al. Triglycerides and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2001;123:2292-2333. [Consultado el 03 de febrero de 2017]. Disponible en <http://circ.ahajournals.org/content/123/20/2292>
40. Berliner J, Heincke J. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996;20:707-727.
41. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
42. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
43. Fernández T. La Inflamación como factor causal emergente de la enfermedad cardiovascular. Pontificia Universidad Javeriana. Especialización en Laboratorio de Inmunología Clínica. Bogotá DC. 2005
44. Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999;147:213-225
45. Simionescu M, Simionescu N. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J* 1993;7:1359-1366.
46. Ros E, Laguna J. Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Revista Española de Cardiología*. 2006;5(Supl.):D 52-61. [Consultado el 02 de febrero de 2017].
47. Gallin J, Kaye D, Leary W. Serum lipids in infection. *The New Engl J Med* 1969;281:1081-1086.
48. Ortega L, Fernández J, Duran G. Enfermedad coronaria aguda: consideraciones diagnósticas y terapéuticas actuales. *Resumed* 2001;14(4):162-75
49. Badimón L, Martínez J. Disfunción endotelial. *Revista Española de Cardiología* 2006;6(Supl.):A21-30. [Consultado el 03 de febrero de 2017] Disponible en <http://www.revespcardiol.org/en/node/2045918>
50. Aranceta J, Fox M, Gil B, Mantilla T, Millan J, Moreno S. Dieta y Riesgo cardiovascular. Madrid España. Editorial Medica Panamericana, 2007
51. Llevadot J. Síndromes coronarios agudos. Madrid España. Editorial Elsevier, 2004
52. Gil A. Tratado de nutrición. 2da Edición Madrid España. Editorial Medica Panamericana, 2010

53. Pyörälä K, De Backer G, Graham I, Poole-Wilson P, Wood D. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension. *Atherosclerosis*. 1994;110:121-161.
54. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-924.
55. Brown M, Kovanene P, Goldstein J. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981;212:628-635.
56. Hurt-Camejo E, Camejo G, Mecanismos aterogénicos de las lipoproteínas. En: Carmena R, Ordovás J. editores. *Hiperlipemias. Clínica y tratamiento*. Barcelona: Ediciones Doyma S.A. 1999; pag 63-83.
57. Davies PT, Tripathi SC. Mechanical stress mechanism and the cell. An endothelial paradigm. *Cir Res* 1993;72:239-245.
58. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I focal increases in arterial LDL concentrations precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*. 1989;9:895-907.
59. Schwenke D. Selective increase in cholesterol at atherosclerosis-susceptible aortic sites after short-term cholesterol feeding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1928-1937.
60. Smith EB, Slater RS. Relationship between low density lipoprotein in aortic intima and serum lipid levels. *Lancet* 1972;1:463-469
61. Navab M, Berliner J, Watson A, Hama S, Territo M, Lusis A, et al. The Yin and Yang of oxidation in there development of the fatty streak. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:831-842.
62. Guyton JR. Phospholipid hydrolytic enzymes in a "cesspool" of arteria intimal lipoproteins: A mechanism for atherogenic lipid accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:884-886.
63. Khoo JC, Miller E, McLoughlin P, Steinberg D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis*1988;8:348-358.
64. Fiegenbaum M, Michelsen F y Hutz M. Association between plasma lipid parameters and APOC3 genotypes in Brazilian subjects: Effect of gender, smoking and APOE genotypes. *Clin Chim Act* 2007;380:175-181.
65. Boyle, K, Phillips M, Lund-Katz S. Kinetics and mechanism of exchange of apolipoprotein C-III molecules from very low density lipoprotein particles. *Biochim Bioph Act* 1999;1430:302- 312.
66. Shoulders C, Grantham T, North J, Gaspardone A, Tomai F, De Fazio A, y eols. Hypertriglyceridemia and the apolipoprotein CIII gene loeus: lack of assoeiation with the variant insulin response element in Itálian school children. *Hum Gen* 1996;98: 557-566.

67. Kleina R, MeHenrye M, Lokd K, Huntera S, Lee N, Jenkinsa A y cols. Apolipoprotein C-III protein eonecentrations and gene polymorphisms in Type 1 diabetes Assoeiations with mierovascular disease complieations in the DCCT/EDIC eohor. *J. Clin Invest.* 2005;19:18- 25.
68. Gangabadage C, Zdunek J, Tessari M, Nilson S, Olivecrona G, Wijmenga S. Structure and dynamics of human apolipoprotein CIII. *J Biol Chem* 2008;283:17416-17427. [Consultado el 04 de febrero de 2017] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M800756200>
69. Sherine Brown, Jose M. Ordovas, Hannia Campos. Interaction between the APOCE gene promoter polimorphims, saturated fat intake and plasma lipoproteins. *ELSEVIER* 2003. *Atherosclerosis* 170:307-313.
70. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001;294:169-173
71. Van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AJ, Levels JM, Reistma PH, Boers W, Chamuleau FM. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 2001; 276:44512-44520
72. E. Faure Noguerras, E. Esteve La fuente Apolipoproteína A-V, *DIABETOL* 2002;18:199-202.
73. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001;294(5540):169-173.
74. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet* 2002;11:3031-3038.
75. Talmud PJ, Martin S, Taskinen M-R, Frick MH, Nieminen MS, Kesaniemi YA, et al. APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study. *J Lipid Res* 2004;45:750-756.
76. Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM, et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet.* 2002;11:3039-46.
77. Welsh KI., Bunce M. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. *Rev Immunogenet* 1999;1:157-176.
78. Hegele RA, Connelly PW, Hanley AJ, Sun F, Harris SB, Zinman B. Common genomic variation in the APOC3 promoter associated with variation in plasma lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2753–2758.
79. Talmud P, Hawe E , Martin S , Olivier M , Miller G , Rubin E , Pennacchio L, Humphries S. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Human Molecular Genetics*, 2002;11(24):3039–3046

80. Talmud P, Hawe E , Martin S , Olivier M , Miller G , Rubin E , Pennacchio L, Humphries S. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Human Molecular Genetics*, 2002;11(24):3039–3046:
81. Raquel Iniesta, elizabeth Guino, Victor Moreno, Analisis Estadístico De Polimorfismos Genéticos En Estudios Epidemiológicos (consulta 15/09/2017) disponible en :[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-91112005000400011](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112005000400011)
82. Maikel Larsoon, Evelina Vorrsjo, Talmud Philipina, Apolipoproteínas CI y C-III inhiben la actividad de la lipoproteína lipasa por desplazamiento de la enzima de las gotitas lipídicas (citado 10/09/2017) disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837139/>
83. Carlos O Mendivil , <sup>1,2</sup>Chunyu Zheng , <sup>1</sup>Jeremy Furtado , <sup>1</sup>Julián Lel , <sup>1</sup> y Frank M Sacks Metabolismo de VLDL y LDL que contiene apolipoproteína C-III y no otras pequeñas apolipoproteínas (citado el 10/09/2017) disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2818784/>
84. Camejo German, Pia Davidsson Contribución de la apolipoproteína CIII a la aterogenicidad de las dislipidemias (citado 18/08/2017) disponible en <http://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-articulo-contribucion-apolipoproteina-ciii-aterogenicidad-las-S0214916812000307>
85. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med*. 80:753-69
86. M.I. Noble, A.J. Drake-Holland, H. Vink Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process *Quart J Med*, 101 (2008), pp. 513-518
87. B.F. Asztalos, D. Collins, L.A. Cupples, S. Demissie, K.V. Horvath, H.E. Bloomfield
88. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005).
89. Richard L. Klein, M. Brent McHenry, Kerry H. Lok, Steven J. Hunter, Ngoc-Anh Le, Alicia J. Jenkins, Deyi Zheng, Andrea J. Semler, W. Virgil Brown, Timothy J. Lyons, W. Timothy Garvey, and the DCCT/EDIC Research Group
90. Shoulders CC, Grantham TT, North JD, et al: Hypertriglyceridemia and the apolipoprotein CIII gene locus: Lack of association with the variant insulin response element in Italian school children. *Hum Genet* 98:557-566, 1996
91. Dallongeville J, Meirhaeghe A, Cottel D, et al: Gender associated association between genetic variations of APOC-III gene and lipid and lipoprotein variables in northern France. *Arteriosclerosis* 150:149-157, 2000

92. Wijsman EM, Brunzell JD, Jarvik GP, et al: Evidence against ApoCIII AND LIPOPROTEINS IN TYPE 1 DIABETES 1303 linkage of familial combined hyperlipidemia to the apolipoproteinAI-CIII-AIV gene complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:215-226, 1998
93. Dammerman M, Sandkuijl LA, Halaas JL, et al: An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3 untranslated region polymorphisms. *Proc Natl AcadSci USA* 90:4562-4566, 1993
94. Hoffer MJ, Sijbrands EJ, De Man FH, et al: Increased risk for endogenous hypertriglyceridaemia is associated with an apolipoproteinC3 haplotype specified by the SstI polymorphism. *Eur J Clin Invest* 28:807-812, 1998
95. O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem*. 2005.
96. Zhao SP, Hu S, Hu M, Liu Q, Wu Q, Wu LJ, et al. Association of human apolipoprotein A5 with lipid profiles affected by gender. *Clin Chem Acta*. 2006.
97. Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrins C, Van Der Vliet HN, Chamuleau RA, et al. Apo AV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride production and stimulating lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem*. 2004
98. Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, et al. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem*. 2003.
99. Nicolás Saavedra, Alejandro Cuevas, Alfonso Hernández, José Caamaño, Priscilla Jaramillo, Fernando Lanás, Luis A. Salaza. Genetic polymorphisms of APOA5 are associated with hypertriglyceridemia and hyperglycemia in Chilean subjects with coronary artery disease and controls.
100. Homeostasis model assessment (HOMA) values in Chilean elderly subjects María Luisa Garmendia, Lydia Lera, Hugo Sánchez, Ricardo Uauy, Cecilia Albala.
101. Paglione AM, Juárez, Peñalva H, Schreier L, López G, Val A. "Enfermedad coronaria: nuevos parámetros bioquímicos. Utilidad de las apolipoproteínas A1 y B." *Acta Bioq Clin Latioam*, 28, 469-478, 1984

## ANEXO "A"



Universidad Central de Venezuela

Faculta de Medicina

Escuela de Bioanálisis

Laboratorio de Ciencias Básicas y Aplicadas



### Hipertriacilgliceridemia postprandial y su asociación con los polimorfismos -482C>T, -455T>C del gen *APOC<sub>3</sub>* y -1135 T>C del gen *APOA<sub>5</sub>*

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

En el presente documento yo \_\_\_\_\_

C.I. N°: \_\_\_\_\_, mayor de edad, domiciliado en \_\_\_\_\_, declaro que he sido informado sobre el estudio que se está realizando y de la necesidad de practicar la recolección de 10 mL de sangre en ayunas (12 horas aproximadamente); muestra que será extraída por punción venosa, previa asepsia de la región anterior del brazo, y tomando las medidas y consideraciones necesarias para evitar la éxtasis venoso y hemólisis. Posteriormente se me suministrará un desayuno que consiste en una (1) empanada de queso y un (1) café con leche. Bajo la misma técnica se me extraerán 10mL de sangre a las 2 y 4 horas posteriores a la ingesta de este alimento, con fines de diagnóstico o terapéutico.

Se me ha explicado los posibles resultados y que el objeto del estudio es: estudiar los triglicéridos postprandiales y si estos se encuentran elevados su posible relación con los polimorfismos en los genes de *APOC<sub>3</sub>* y *APOA<sub>5</sub>*.

Se me ha explicado los cuidados, precauciones que necesito seguir después de la toma de las muestras de sangre mencionadas anteriormente.

Comprendo que las muestras obtenidas serán evaluadas por el laboratorio de ciencias básicas y aplicadas de la escuela de Bioanálisis de la UCV para su estudio, que puedo revocar mi consentimiento para el procedimiento propuesto, en cualquier momento y el procedimiento a realizar.

\_\_\_\_\_

Firma de la paciente

C.I: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma del testigo

C.I: \_\_\_\_\_

## ANEXO "B"



Universidad Central de Venezuela  
Faculta de Medicina  
Escuela de Bioanálisis



Laboratorio de Ciencias Básicas y Aplicadas

### HIPERTRIAICILGLICERIDEMIA POSTPRANDIAL Y SU ASOCIACIÓN CON EL POLIMORFISMO -482C>T, -455T>C DEL GEN APOC<sub>3</sub> Y -1135 T>C DEL GEN APOA<sub>5</sub>

Fecha:\_\_\_\_\_ Lugar:\_\_\_\_\_ N° de planilla:\_\_\_\_\_

#### Parte A. Datos Personales:

Nombres y apellidos:\_\_\_\_\_ C.I:\_\_\_\_\_

Edad:\_\_\_\_\_ Sexo:\_\_\_\_\_ Fecha de nacimiento:\_\_\_\_\_

Profesión:\_\_\_\_\_ Dirección actual: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

#### Parte B. Antecedentes Personales:

- Patología de base: Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Tipo:\_\_\_\_\_
- Tabaquismo: Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Frecuencia:\_\_\_\_\_
- Ingesta de bebidas alcohólicas: Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Frecuencia:\_\_\_\_\_
- Drogas/Medicamentos: Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Tipo:\_\_\_\_\_

#### Parte C. Antecedentes Familiares:

Enfermedad cardiovascular (ECV): Si:\_\_\_ No:\_\_\_  
¿Cuál?\_\_\_\_\_ Parentesco:\_\_\_\_\_

Diabetes: Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Parentesco:\_\_\_\_\_

Dislipidemias: Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Parentesco:\_\_\_\_\_

Síndrome metabólico: Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Parentesco:\_\_\_\_\_

Obesidad. Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Parentesco:\_\_\_\_\_

Otras: Si:\_\_\_ No:\_\_\_ ¿Cuál?\_\_\_\_\_ Parentesco:\_\_\_\_\_

#### Parte D. Examen físico:

Peso (Kg):\_\_\_\_\_

Talla (Cm): \_\_\_\_\_

Índice de masa corporal (IMC): \_\_\_\_\_