



Artículo original

Polimorfismos en el gen lipoproteína lipasa como marcadores genéticos para enfermedad cerebrovascular en la población colombiana: estudio de casos y controles

Polymorphisms of the lipoprotein lipase gene as genetic markers for stroke in colombian population: a case control study

Leydi Carolina Velásquez Pereira¹, Clara Inés Vargas Castellanos¹, Federico Arturo Silva Sieger²

¹Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.,

²Grupo de Ciencias Neurovasculares. Fundación Cardiovascular de Colombia, Bucaramanga, Colombia.

Velásquez PLC, Vargas CCI, Silva SFA. Polymorphisms of the lipoprotein lipase gene as genetic markers for stroke in colombian population: a case control study. Colomb Med (Cali). 2016; 47(4):189-95.

© 2016 Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acrediten.

Historia:

Recibido: 25 agosto 2014
Revisado: 02 diciembre 2015
Aceptado: 06 noviembre 2016

Palabras clave:

Enfermedad coronaria, lipoproteína lipasa, genotipo, Infarto del miocardio, polimorfismo genético, Polimorfismos de nucleótido simple, Riesgo, Colombia

Keywords:

Coronary Disease, Lipoprotein lipase, Genotype, Myocardial Infarction, Polymorphism Genetic, Lipoprotein Lipase, Polymorphism Single Nucleotide, Risk, Colombia

Resumen

Objetivo: Determinar la asociación entre los polimorfismos en el gen LPL (rs320, rs285 y rs328), y la enfermedad cerebrovascular isquémica aguda en una muestra de población colombiana.

Métodos: A partir de un diseño de casos y controles, se estudiaron 133 casos con enfermedad cerebrovascular isquémica aguda (diagnóstico clínico y TAC), y 269 controles sin enfermedad cerebrovascular. Se examinó los polimorfismos rs320, rs285 y rs328 en el gen LPL con la técnica PCR-RFLP.

Resultados: En el presente estudio no se encontró asociación entre rs320, rs285 y rs328 con la enfermedad cerebrovascular isquémica aguda en la muestra analizada; siendo las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos similares entre casos y controles, y se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. El estudio fue avalado por el comité de ética de las instituciones vinculadas y todos los pacientes dieron consentimiento informado.

Conclusión: Los polimorfismos en el gen de la LPL no tienen utilidad como marcadores genéticos asociados con la presentación de la enfermedad cerebrovascular isquémica aguda en la muestra analizada.

Abstract

Objective: To analyze if there is an association between the presence of polymorphisms in the LPL gene (rs320, rs285 and rs328) with development of acute ischemic stroke in Colombian population.

Methods: In a case control design, 133 acute ischemic stroke patients (clinical diagnosis and x-ray CT) and 269 subjects without stroke as controls were studied. PCR-RFLP technique was used to detect rs320, rs285 and rs328 polymorphisms in the LPL gene.

Results: In the present research was not found any association between any of the LPL gene polymorphism and acute ischemic stroke in the population studied; the allele and genotypic frequencies of the studied polymorphisms were similar in cases and controls and followed the Hardy-Weinberg equilibrium. The study was approved by the IRB and each subject signed the informed consent.

Conclusion: LPL gene polymorphisms are not genetic markers for the development of stroke in the Colombian sample used.

Autor de correspondencia:

Leydi Carolina Velásquez Pereira. Carrera 32 No. 29-31. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. +57 6 6356641. Email: leydicarolina.velasquezpereira@kuleuven.be.

Introducción

La Enfermedad Cerebrovascular (ECV) se caracteriza por un déficit neurológico atribuido a una lesión focal aguda del sistema nervioso central de causa vascular, que incluye el infarto cerebral, la hemorragia intracerebral y la hemorragia subaracnoidea¹. Se han documentado diferentes factores de riesgo asociados con la ECV isquémica, dentro de los que se encuentran la hipertensión arterial, alteraciones en el metabolismo lipídico, diabetes, tabaquismo, dieta, obesidad e inactividad física. Sin embargo, estos factores no explican completamente el desarrollo de esta patología, por lo que se ha ampliado el estudio de otros factores de riesgo o factores emergentes, los cuales además podrían explicar las diferencias del comportamiento de la ECV isquémica en diferentes poblaciones y posibles susceptibilidades poblacionales. Es en este último caso en el que los factores genéticos cobran importancia como potenciales factores de riesgo.

La lipoproteína lipasa es una enzima encargada de la hidrólisis de tiacilglicérols provenientes de quilomicrones circulantes y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), removiendo las lipoproteínas de circulación. El gen que codifica esta proteína se localiza en el cromosoma 8p22 y abarca 30 Kb, contiene 10 exones de los cuales 9 codifican una proteína de 475 aminoácidos. Estudios genéticos han revelado cerca de 100 mutaciones y polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en el gen de la lipoproteína lipasa², mostrando que alteraciones en dicha lipoproteína pueden afectar la formación de la placa ateromatosa aumentando el riesgo de eventos isquémicos. Dentro de los polimorfismos estudiados se encuentran algunos que actúan como marcadores de riesgo o protección; para el primer caso, rs320 (8:19961566) ubicado en el intrón 8 producto de un cambio de Timina (T) por Guanina (G), y rs285 (8:19957678) ubicado en el intrón 6 producto de un cambio de Citosina (C) por Timina, han sido asociados con altos niveles de tiacilglicérols (TG) y bajos niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL)^{3,4}. Por otra parte, rs328 (8:19962213) en el exón 9 producto del cambio de Citosina (C) por Guanina (G), se ha visto que actúa como marcador de protección para desarrollar ECV debido al aumento de la actividad lipolítica en la proteína, con aumento del HDL y disminución de los tiacilglicérols⁵.

La investigación sobre estos polimorfismos se ha llevado a cabo en diferentes poblaciones, encontrándose variaciones en los resultados obtenidos sobre su influencia en el control lipídico, dependiente de la etnia y la zona de origen de los pacientes. El análisis de los polimorfismos en el gen de la lipoproteína lipasa rs320, rs285 y rs328 y el estudio de la distribución étnica de los polimorfismos en población colombiana, constituye el primer estudio en Colombia en evaluar la asociación de ellos a la LPL en pacientes con ECV isquémico agudo. Se plantea la hipótesis acerca de la asociación de estos polimorfismos (rs320, rs285 y rs328), ubicados en el gen de la lipoproteína lipasa como marcadores de exposición para el desarrollo de ECV isquémica en población colombiana.

Materiales y Métodos

Diseño y población

Estudio de casos y controles. Los casos fueron tomados de pacientes atendidos con un diagnóstico de un primer evento de ECV isquémico agudo en clínicas de las ciudades de Cali (Fundación Valle de Lili), Bogotá (Hospital Santa Clara),

Bucaramanga (Fundación Cardiovascular de Colombia) y Medellín (Hospital San Vicente de Paul), entre los años 2003 y 2007. Los controles se reclutaron de la muestra de personas que asistieron, en la misma fecha, a las instituciones como parte de la visita a estas instituciones. No tenían ninguna relación de consanguinidad con los casos. La población se tomó de un estudio previo realizado para evaluar factores de riesgo para ECV isquémica en la población colombiana⁶.

El estudio contó con la aprobación de los Comités de Ética en investigación de todas las instituciones involucradas en el estudio y los pacientes firmaron el consentimiento informado al ingresar al estudio.

Se analizaron como casos a 133 pacientes de ambos sexos, mayores a 18 años, con enfermedad cerebrovascular (ECV) isquémica. El diagnóstico fue sustentado con una Tomografía Axial Computarizada (TAC). Se incluyeron como controles a 269 sujetos de ambos sexos, mayores a 18 años sin ECV isquémico ni consanguinidad con los casos. Los controles eran sujetos que visitaban los centros de salud en donde se encontraban los pacientes con ECV.

Se tuvieron en cuenta los criterios de exclusión: antecedente de cirugía reciente (30 días previos), cáncer, enfermedad hematológica, hepática o renal (Creatinina mayor de 1.5 mg), pacientes en tratamiento con anti-inflamatorios (excepto ASA en dosis como antiagregante 75 a 300 mg/dL), mujeres en embarazo y pacientes con eventos cardioembólicos.

Se analizó la información sociodemográfica como edad, género y los factores de exposición como perfil lipídico (Colesterol Total, Triacilglicérols, colesterol HDL, colesterol VLDL, colesterol LDL) uso de hipolipemiantes y resultados de genotipificación.

Cálculo de tamaño de muestra

El cálculo de tamaño de muestra se realizó teniendo en cuenta la frecuencia del alelo de menor prevalencia para los polimorfismos rs320, rs285 y rs328 en los casos, reportado en previos estudios. Se usó el software EPIDAT 4*.

En el estudio de Nicklas *et al.*, realizado en una población estadounidense se encontró que la frecuencia de menor prevalencia para el polimorfismo rs320 fue el alelo G (39%), para rs285 fue el alelo T (49%) y en rs328 fue el alelo G (15%)⁷, esta última prevalencia fue la usada para el cálculo del tamaño de muestra al ser la más baja de los tres polimorfismos analizados en los casos. Para el cálculo de tamaño de muestra se tuvo en cuenta un nivel de confianza 95%, poder 86%, Odds ratio (OR) para rs320 y rs285 de 2.0, y para rs328 0.5, con una relación caso: control 1:1 (Tabla 1). Adicional a esto se realizó un ajuste del tamaño de muestra por pérdida de datos.

Tabla 1. Cálculo del tamaño de muestra y poder.

Polimorfismo	Alelo	Frecuencia* (%)	OR	Tamaño de muestra (Casos/controles)	Poder (%)
rs320	G	392	2.0	182/182 133/269	86.0 89.3
rs285	T	4985	2.0	162/162 133/269	86.0 92.5
rs328	G	1528	0.5	244/244 133/269	86.0 78.8

*Frecuencia de Alelos tomada de referencia 7

Tabla 2. Primers de los polimorfismos estudiados, enzimas de digestión y fragmentos resultantes. Las electroforesis se realizaron con Agarosa 2%. 80 V x 45 minutos y con temperatura 37° C y 16 horas.

Primers (5'->3')	Enzimas y secuencia palindrómicas	Fragmentos resultantes*	Alelo
rs328	4 U MnlI		
5'-CTGATTCTGATGTGGCCTGA-3'	5'...CCTC (N)7^...3'	315 y 20	C
5'-CATGAAGCTGCCTCCCTTAG-3'	3'...GGAG (N)6^...5'	256, 59 y 20	G
rs320	4 U HindIII		
5'-GATGCTACCTGGATAATCAAAG-3'	5'-A^ AGCTT-3'	140 y 210	T
5'-CTTCAGCTAGACATTGCTAGTGT-3'	5'-TTCTGA_A-3'	350	G
rs285	4 U PvuII		
5'-ATCAGGCAATGCGTATGAGGTAA-3'	5'-CAG^CTG-3'	431	C
5'-GAGACACAGATCTCTTAAGAC-3'	5'-GTC_AGAC -3'	222 y 209	T

* Marcador DNA 50 pb. Todos los datos en pares de bases

Análisis de ADN

El ADN fue extraído a partir del buffy coat de cada paciente el cual se encontraba almacenado a -70° C. La técnica de extracción usada fue Fenol cloroformo. Los polimorfismos en el gen *LPL* fueron determinados usando la reacción en cadena de polimerasa-polimorfismos de fragmentos de tamaño de restricción (PCR-RFLP)

Amplificación de ADN

El DNA genómico (13uL) fue mezclado con 200 umol de cada primer, 50 umol/L de cada uno de los cuatro nucleótidos, 2.5 mM de MgCl₂ y 1 U de Taq polimerasa (Promega(r)). El volumen inicial de la mezcla para PCR fue de 25 uL. Cada uno de los polimorfismos tuvo un protocolo de amplificación con diferente temperatura de hibridación. El protocolo de amplificación general fue por la desnaturalización inicial a 94° C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos; una desnaturalización a 94° C durante 5 minutos, una hibridación (rs320 55° C, rs285 57° C y rs328 60° C) durante 1 minuto y una extensión a 77° C durante 10 minutos, y una extensión final a 77° C durante 10 minutos. Los primers para llevar a cabo la amplificación de los tres polimorfismos estudiados en el gen de la *LPL*, las enzimas de digestión, gel de electroforesis y fragmentos resultantes se encuentran descritos en la Tabla 2.

Digestión y electroforesis

Al producto de amplificación se le agregaron 5 uL de una mezcla para digestión que contenía el buffer recomendado para cada enzima de restricción respectivamente y posteriormente fue incubado durante la noche a 37° C. Las enzimas de restricción usadas fueron HindIII (New England biolabs®), PvuII (New England biolabs®), MnlI (New England biolabs®) para las mutaciones rs320, rs285 y rs328. Se hizo electroforesis en gel de agarosa al 2% a 80 V por 45 minutos. El DNA fue visualizado por coloración de los geles con bromuro de etidio y observado con un transiluminador.

Análisis estadístico

Para el análisis se construyó una base de datos por duplicado, se verificó su contenido con la herramienta Validate del software Epi Info®, calculando medias con desviaciones estándar, frecuencias y porcentajes de las variables estudiadas. La distribución de los alelos se evaluó por la prueba de Chi cuadrado. Para comparar variables categóricas se utilizó la prueba de Chi cuadrado, y para

variables continuas la prueba t de Student. La asociación entre el genotipo y el fenotipo se determinó por odds ratio con un intervalo de confianza del 95%, y el valor de *p* 0.05. Las probabilidad de tener un alelo específico es definida como la frecuencia de sujetos portadores entre la frecuencia de sujetos no portadores. El odds ratio para el ECV es la probabilidad del grupo de enfermos de tener el alelo asociado con el desarrollo de ECV frente al grupo de los controles. Un valor de *p* menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo en todos los análisis. El análisis se hizo en los programas Stata12® y SPSS 19®.

Las frecuencias alélicas específicas observadas en casos y controles fueron evaluadas por medio de la prueba equilibrio de Hardy-Weinberg. El estado de equilibrio se da cuando los apareamientos han ocurrido al azar. La presencia de un estado de equilibrio indica que la población estudiada es homogénea con respecto a la frecuencia y distribución de distintos alelos y no es una mezcla de subpoblaciones con distintas frecuencias y distribución de alelos para el gen estudiado. En este último caso (ausencia de equilibrio), si las subpoblaciones tuviesen diferentes riesgos de presentar una enfermedad cerebrovascular, los casos y los controles no serían comparables. El desequilibrio de ligamiento, es la tendencia de los alelos de dos loci separados pero ligados, de encontrarse juntos con más frecuencia de lo que podría esperarse únicamente por la casualidad, se evaluó mediante la estimación de las frecuencias

Tabla 3. Características sociodemográficas y bioquímicas.

Variables	Casos (n=133)	Controles (n=269)	<i>p</i>
Edad (años-rango)	69 (27-93)	64 (26-92)	0.00*
Mujeres	58	136	0.19
Triacilgliceroles (mg/dL)	162.48 ± 93.95	156.40 ± 68.46	0.46
Colesterol total (mg/dL)	201.35 ± 52.88	212 ± 43.88	0.03*
Colesterol LDL (mg/dL)	129.43 ± 44.42	130.61 ± 41.11	0.79
Colesterol HDL (mg/dL)	39.42 ± 12.32	50.17 ± 12.66	0.00*
Colesterol VLDL	32.81 ± 18.78	32.59 ± 17.87	0.91
Uso Hipolipemiantes (%)	16 (12.0)	45 (16.7)	0.22

Los valores se presentan en promedio ± desviación estándar o número de sujetos con porcentaje de total en paréntesis. Valores *p* se calcularon usando la t-student o la prueba de chi cuadrado.

*Valor *p* <0.05.

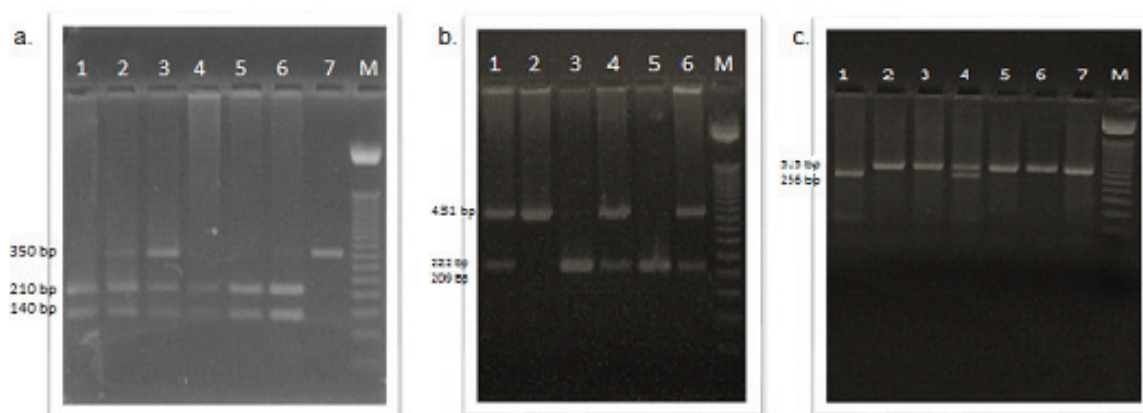


Figura 1. Genotipificación para rs320, rs285 y rs328 en el gen LPL. Polimorfismos de fragmentos de tamaño de restricción (RFLP) en agarosa 2%. a. rs320; pozo 1, 4, 5, 6 genotipo TT; pozo 2, 3, Genotipo GT; Pozo 7, genotipo GG; b. rs285; pozo 1, 4, 6, Genotipo CT; Pozo 2, genotipo CC; pozo 3,5, genotipo TT. c. rs328; Pozo 1, genotipo GG; pozo 2, 3, 5, 6, 7 Genotipo CC; pozo 4 genotipo CG; M, Marcador de peso molecular 50bp.

observadas de los haplotipos específicos, es decir, las posibles combinaciones de alelos en el loci rs320, rs285 y rs328. Los cálculos para genética de poblaciones se hicieron en el programa snpstats y Arlequin 3.5.1.2*.

Resultados

Características sociodemográficas y bioquímicas

Se incluyeron 402 sujetos, 133 casos y 269 controles. La edad promedio de los casos fue de 69 años en los casos y de 64 años en los controles, con una proporción similar de hombres y mujeres. En la Tabla 3 se presentan las características en relación a edad, sexo y perfil lipídico de los casos y controles. Los niveles de triacilglicérol, colesterol LDL y colesterol VLDL fueron similares en las dos poblaciones estudiadas. La edad de los pacientes con enfermedad cerebrovascular fue significativamente mayor que en los controles. En los casos, los niveles de colesterol total y colesterol HDL se encontraron disminuidos en comparación con los

controles, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. A pesar de no haber diferencias estadísticamente significativas el porcentaje de controles que se encontraban en tratamiento con hipolipemiantes fue mayor que en los casos.

Teniendo en cuenta que se encontraron diferencias estadísticamente significativas con relación a la edad, niveles de colesterol total y colesterol HDL entre los casos y los controles. Se realizó una regresión logística, en donde la edad tuvo un valor OR de 1.04 (IC 95%: 1.03-1.05), el colesterol total tuvo un valor OR de 1.00 (IC 95%: 0.99-1.00) y los niveles de colesterol HDL de OR= 0.94 (IC 95%: 0.93-0.95).

Genotipificación

Los polimorfismos permitieron realizar la asignación alélica en cada una de las muestra para cada polimorfismo (Fig. 1).

Frecuencias genotípicas y alélicas

Las frecuencias genotípicas y alélicas para rs320, rs285 y rs328, no presentaron diferencias estadísticamente significativas tanto en casos como en controles. Para el polimorfismo rs320, el genotipo TT fue el más frecuente en las dos poblaciones estudiadas, 51 y 52% respectivamente. El genotipo más frecuente entre casos y controles para rs285, fue el heterocigoto CT con una frecuencia de 45% y 48% respectivamente. En el polimorfismo rs328 el alelo G tuvo baja frecuencia tanto en casos y controles, 9 y 7% respectivamente, y el genotipo homocigoto GG tuvo la menor frecuencia en las dos poblaciones estudiadas, con un valor de 1%. (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia genotípica y alélica para polimorfismos rs320, rs285 y rs328.

Polimorfismo	Casos (n= 133)*	Controles (n= 269)*	p
Genotipo rs320			
GG	18 (13.5)	29 (11.0)	0.65
GT	46 (34.6)	103 (38.0)	0.52
TT	69 (51.9)	137 (51.0)	0.32
Alelo rs320 T†	69.0	70.0	0.07
Genotipo rs285			
CC	43 (32.0)	73 (27.0)	1.17
CT	64 (48.0)	121 (45.0)	0.35
TT	26 (20.0)	75 (28.0)	3.28
Alelo rs285 T†	44.0	50.0	3.26
Genotipo rs328			
CC	110 (82.7)	232 (86.0)	0.88
CG	22 (16.5)	34 (13.0)	1.13
GG	1 (0.8)	3 (1.0)	0.12
Alelo rs328 G†	9.0	7.0	0.61

*n(%)

† %

Valores p se calcularon usando la prueba de chi cuadrado

Tabla 5. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos en el gen LPL.

Haplotipos	Casos % (n= 133)	Controles % (n= 269)	p
GCC	2.03	2.41	0.74
GCG	2.62	2.41	0.86
GTC	4.94	4.82	0.94
GTG	0.87	0.60	0.68
TCC	18.02	18.37	0.91
TCG	5.52	4.22	0.43
TTC	59.01	59.34	0.93
TTG	6.98	7.83	0.67

Valores p se calcularon usando la prueba de chi cuadrado

Tabla 6. Asociación para cada uno de los modelos de herencia con ECV.

Polimorfismo	Modelo	Genotipo	OR	IC 95%	p
Rs320	Codominante	TT	1.00		0.73
		GT	1.14	0.72-1.80	
		GG	0.87	0.45-1.70	
	Dominante	TT	1.00		0.78
		GT-GG	1.06	0.70-1.62	
	Recesivo	TT-GT	1.00		0.56
		GG	0.82	0.43-1.56	
Rs285	Codominante	CC	1.00		0.14
		CT	1.15	0.70-1.89	
		TT	1.78	0.98-3.22	
	Dominante	CC	1.00		0.22
		CT-TT	1.34	0.84-2.12	
	Recesivo	CC-CT	1.00		0.06
		TT	1.63	0.98-2.72	
Rs328	Codominante	CC	1.00		0.59
		CG	0.77	0.43-1.40	
		GG	1.87	0.19-18.58	
	Dominante	CC	1.00		0.50
		CG-GG	0.82	0.46-1.46	
	Recesivo	CC-CG	1.00		0.64
		GG	0.94	0.20-19.26	

La población se encontró en equilibrio de acuerdo a la prueba de Hardy-Weinberg ($p=0.05$), para los polimorfismos rs285 y rs328 en casos y controles. Por otra parte, para el polimorfismo rs320 la población control está en equilibrio de Hardy Weinberg, pero en los casos no se cumple este equilibrio. Sin embargo al realizar la corrección de Bonferroni, ajustando el valor de significancia a $p=0.02$, este nuevo valor permite que la población analizada alcance el equilibrio de Hardy Weinberg.

Análisis de haplotipos

Los resultados mostraron 8 haplotipos posibles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de las frecuencias haplotípicas entre los casos y los controles. Las frecuencias para cada haplotipo se observan en la Tabla 5. El haplotipo más común fue TCC y el haplotipo menos frecuente en la población fue GTG.

El valor de probabilidad para los marcadores que no presentan asociación gamética, se evaluó utilizando la prueba de chi cuadrado. Se encontró para todos los pares de loci, valores menores de $p=0.05$, lo cual indica que existe asociación gamética entre los loci.

Asociación entre polimorfismos y ECV

Para estudiar la posible asociación entre los polimorfismos estudiados y el desarrollo de ECV se calculó el OR para cada uno de los modelos de herencia. No hubo asociación por evaluación de los OR entre los polimorfismos y el desarrollo de ECV isquémica aguda (Tabla 6).

Discusión

Los datos obtenidos demuestran la no asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos rs320, rs285, rs328 en el gen de la lipoproteína lipasa y el accidente cerebrovascular en la muestra poblacional colombiana analizada. Sugiriendo que los polimorfismos analizados en el presente estudio no se pueden usar como marcadores genéticos para predecir el desarrollo de ECV en la muestra poblacional colombiana estudiada. Este es el primer estudio realizado en Colombia en busca de marcadores genéticos que puedan estar asociados con ECV. En Latinoamérica, hasta la fecha solo se han publicado tres estudios de este tipo en Brasil, y muestran asociación de rs320, rs285 y rs328 con el desarrollo de ECV^{5,8,9}, sin embargo, en otras poblaciones los resultados de asociación han variado.

Las frecuencias de los alelos para rs320, rs285 y rs328 observadas en la población colombiana son comparables a las reportadas en la base de datos dbSNP para la población europea y estudios genéticos llevados a cabo en otras poblaciones^{7,10,11}.

Al realizar el análisis genotípico entre los casos y los controles las frecuencias alélicas para rs320, rs285 y rs328 se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Este hallazgo indica que no hay diferencias significativas entre la prevalencia de los genotipos correspondientes a los polimorfismos en el gen de la lipoproteína lipasa rs320, rs285 y rs328, lo que sugiere una posible falta de asociación de dichos polimorfismos con el desarrollo de ECV isquémico agudo.

Al comparar los resultados obtenidos para el perfil lipídico con los valores de referencia establecidos por el “National Cholesterol Education Program”, se encontró que el colesterol total y los triacilglicérols se encontraron en el nivel límite alto en los dos grupos estudiados. El nivel de LDL en los casos fue el óptimo, sin embargo para los controles fue intermedio alto. Adicionalmente, se realizó una regresión logística con las variables en donde se observaron diferencias significativas entre los casos y controles, encontrándose que la edad actúa como un factor de riesgo para el desarrollo de ECV isquémica aguda. Por otra parte los niveles de colesterol HDL se comportan como un factor de protección para ECV isquémica, similar a lo reportado en la literatura¹². En este estudio no se consideró evaluar la asociación de los polimorfismos con los niveles en el perfil lipídico, debido a que en estudios previos han fallado en encontrar dicha asociación, con resultados inconsistentes¹³.

Varios estudios han evaluado los polimorfismos en el gen de la lipoproteína lipasa rs320, rs285 y rs328 y la asociación con ECV. La mutación rs328 ha sido analizada extensamente pero los resultados de su actividad lipolítica y su efecto como factor de protección varían. En algunas poblaciones se ha observado una mayor actividad de la lipoproteína lipasa y en otras una actividad 45% mayor a la actividad normal lipolítica. Se ha demostrado su efecto protector para ECV en población francesa¹⁴, japonesa¹⁵, china¹⁶, finlandesa¹⁷, inglesa¹⁸, sueca¹⁹, brasilera^{5,8}, árabe²⁰, holandesa²¹, pero no en la griega²² ni en la norteamericana⁷.

Estudios en la población de Estados Unidos⁷, Francia¹⁴, Gales¹¹, India²³, China¹⁶, Japón¹⁵, Brasil⁵, Túnez²⁴ y Alemania²⁵ han evidenciado que la presencia del polimorfismo rs320 altera los niveles lipídicos y actúa como marcador de predisposición para el desarrollo de ECV. Pero en Rusia²⁶, Arabia Saudita²⁰ e Italia²⁷ no se encontró dicha asociación.

rs285 se asoció con niveles elevados de triglicéridos, bajo colesterol HDL y un aumento en la severidad de la enfermedad coronaria en pacientes con Diabetes Mellitus II. Esto ha sido revelado en poblaciones de China¹⁶, Estados Unidos^{7,28}, Brasil⁵, Australia²⁹, Francia¹⁵ y Japón¹⁶. Mientras en Macedonia³⁰ y Arabia Saudita²⁰ no hubo diferencia entre la distribución de los polimorfismos tanto en los sanos como en los controles.

Los polimorfismos rs320, rs285 y rs328 del gen *lipoproteína lipasa* se seleccionaron por ser los más comúnmente referenciados en la literatura, y se han encontrado involucrados en alteraciones de los perfiles lipídicos en las poblaciones estudiadas. Se justificó el estudio de los polimorfismos rs320 y rs285, ubicados en regiones intrónicas del gen *lipoproteína lipasa* (8 y 6 respectivamente), por su comportamiento como marcadores de riesgo, la importancia de estudiar dichas regiones se produce porque se ha mostrado que ciertas secuencias intrónicas contienen elementos que regulan la transcripción y traducción de genes, además actúan como marcadores de mutaciones funcionales y alteran la secuencia de aminoácidos³. En este estudio no se encontró asociación con rs320 y rs285 con ECV isquémica posiblemente porque dichas mutaciones se producen en un sitio del gen de la LPL en donde es poco probable que esta mutación sea funcionalmente relevante. Por otra parte, rs328 puede estar involucrada en la homeostasis cardiovascular, y estar sujeto a cambios producidos por otros factores genéticos, ambientales o ambos²². Además, el ECV isquémico es una enfermedad multifactorial, por lo tanto es posible que varios genes puedan estar influyendo en la presentación de la

enfermedad, es decir, producto de interacciones complejas entre la predisposición genética y el ambiente.

Adicionalmente, se contó con un tamaño de muestra limitado, siendo esta una restricción importante para el estudio. Es posible que la asociación entre los marcadores y el desarrollo de la enfermedad cerebrovasculares sea muy bajo, y el tamaño de muestra poblacional usado no fue suficientemente grande para detectarla o que existan otros marcadores de exposición para la ECV. El poder de los resultados obtenidos para los polimorfismos rs320 y rs285 tiene un valor estadístico superior al 86%. El poder obtenido para rs328 fue inferior al 86%, por tanto el análisis de asociación es insuficiente en poder, sin embargo se están aportando datos de prevalencia de dicho polimorfismo en la muestra poblacional colombiana utilizada.

El análisis de marcadores genéticos para el ECV isquémico es una herramienta de predicción de riesgo, simple y precisa, que aporta datos que pueden ser usados para mejorar la asignación de recursos de salud, identificar personas con alto riesgo y captación de estas, a través de los sistemas de salud, identificar los factores de riesgo asociados, vigilar las tendencias con el transcurso del tiempo, proporcionar la base para diseñar y ejecutar intervenciones, vigilar y evaluar la eficacia de las intervenciones, creación de redes de investigación, determinación de las prioridades propias de cada país para la prevención y el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares en el contexto de planes nacionales integrados para la prevención y el control de las enfermedades crónicas y comparaciones de datos obtenidos entre poblaciones y dentro de cada población. Sin embargo el presente análisis mostró que la diferencia en la distribución de los polimorfismos en el gen *lipoproteína lipasa* rs320, rs285 y rs328, en pacientes con ECV isquémico agudo y sujetos sanos, no actúan como marcadores de riesgo estadísticamente significativos para el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular en la población estudiada.

En futuros estudios se podría evaluar SNPs que puedan estar influyendo con otros factores de riesgos para el ECV isquémico como la obesidad, diabetes e hipertensión, teniendo en cuenta que algunos factores ambientales pueden afectar también el desarrollo de la enfermedad. Esto con el apoyo de técnicas moleculares, biológicas y genéticas que permitan elucidar los mecanismos etiopatogénicos del ECV.

Agradecimientos:

Agradecemos a la Fundación Cardiovascular de Colombia y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander. Se agradece a su vez a las instituciones y al personal que participó en el reclutamiento de pacientes

Financiación:

El presente proyecto fue financiado por COLCIENCIAS Código 6566-51-929173 y fue ejecutado por una Joven Investigadora de COLCIENCIAS, convocatoria 566 de 2012

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe un conflicto de intereses

Referencias

1. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A. An updated definition of stroke for the 21st century a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013; 44(7): 2064-89.

2. Wong H, Davis RC, Thuren T, Goers JW, Nikazy J, Waite M. Lipoprotein lipase domain function. *J Biol Chem*. 1994; 269(14): 10319–23.
3. Chen Q, Razzaghi H, Demirci FY, Kamboh MI. Functional significance of lipoprotein lipase HindIII polymorphism associated with the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2008; 200(1): 102–8.
4. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 297(2): E271–88.
5. Sepetiba RJ, Andrade J, Hirata RD, Hirata MH, Sepetiba CR, Nakamura Y. Lipoprotein lipase PvuII polymorphism is associated with variations in serum lipid levels in non-diabetic pregnant women. *Brazil J Med Biol Res*. 2007; 40(7): 919–26.
6. Silva FA ZJ, Quintero C, Arenas W, Rueda-Clausen CF. Enfermedad cerebrovascular en Colombia. *Rev Colomb Cardiol*. 2006; 13: 85–9.
7. Nicklas BJ, Ferrell RE, Rogus EM, Berman DM, Ryan AS, Dennis KE. Lipoprotein lipase gene variation is associated with adipose tissue lipoprotein lipase activity, and lipoprotein lipid and glucose concentrations in overweight postmenopausal women. *Human Genetics*. 2000; 106(4): 420–4.
8. Gígek Cde O, Chen ES, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araujo LM, Payao SL. Association of lipase lipoprotein polymorphisms with myocardial infarction and lipid levels. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 45(5): 599–604.
9. Salazar LA, Hirata MH, Giannini SD, Forti N, Diamant J, Lima TM. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. *Clin Chim Acta*. 2000; 300(1-2): 139–49.
10. Morabia A, Cayanis E, Constanza MC, Ross BM, Flaherty MS, Alvin GB, Das K, Morris MA. Association between lipoprotein lipase (LPL) gene and blood lipids: a common variant for a common trait? *Genet Epidemiol*. 2003; 24: 309–21.
11. Mattu RK, Needham EW, Morgan R, Rees A, Hackshaw AK, Stocks J. DNA variants at the LPL gene locus associate with angiographically defined severity of atherosclerosis and serum lipoprotein levels in a Welsh population. *Arteriosclerosis Thrombosis*. 1994; 14(7): 1090–17.
12. Mendis S, Puska P, Norrving B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization; Geneva: 2011.
13. Kay A, März W, Hoffmann MM, Zhang Q, Masana L, Cavanha J. Coronary artery disease and dyslipidemia within Europe genetic variants in lipid transport gene loci in German subjects with premature coronary artery disease. *Atheroscler Suppl*. 2002; 3(1): 27–33.
14. Jemaa R FF, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou JP, Bard JM, Fruchart JC. Lipoprotein lipase gene polymorphisms associations with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study. Etude Cas Témoin sur l'infarctus du Myocarde. *J Lipid Res*. 1995; 36(10): 2141–6.
15. Shimo-Nakanishi Y, Urabe T, Hattori N, Watanabe Y, Nagao T, Yokochi M. Polymorphism of the lipoprotein lipase gene and risk of atherothrombotic cerebral infarction in the Japanese. *Stroke*. 2001; 32(7): 1481–6.
16. Xu E, Li W, Zhan L, Guan G, Wang X, Chen S. Polymorphisms of the lipoprotein lipase gene are associated with atherosclerotic cerebral infarction in the Chinese. *Neuroscience*. 2008; 155(2): 403–8.
17. Yin R, Wang Y, Chen G, Lin W, Yang D, Pan S. Lipoprotein lipase gene polymorphism at the PvuII locus and serum lipid levels in Guangxi Hei Yi Zhuang and Han populations. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44(12): 1416–21.
18. Stocks J, Thorn JA, Galton DJ. Lipoprotein lipase genotypes for a common premature termination codon mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis and restriction digestion. *J Lipid Res*. 1992; 33(6): 853–7.
19. Rachel E. Peacock AH, Peter Nilsson-Ehle, Steve E Humphries. Associations between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlations of lipids, lipoproteins and lipase activities in young myocardial infarction survivors and age-matched healthy individuals from Sweden. *Atherosclerosis*. 1992; 97(2): 171–85.
20. Abu-Amro KK, Wyngaard CA, Al-Boudari OM, Kambouris M, Dzimir N. Lack of association of lipoprotein lipase gene polymorphisms with coronary artery disease in the Saudi Arab population. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127(5): 597–600.
21. Kuivenhoven JA, Groenemeyer BE, Boer JM, Reymers PW, Berghuis R, Bruin T. Ser447stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17(3): 595–9.
22. Fidani L, Hatzitolios AI, Goulas A, Savopoulos C, Basayannis C, Kotsis A. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B and lipoprotein lipase Ser447Ter gene polymorphisms are not associated with ischaemic stroke in Greek patients. *Neurosci Lett*. 2005; 384(1-2): 102–5.
23. Munshi A, Babu MS, Kaul S, Rajeshwar K, Balakrishna N, Jyothy A. Association of LPL gene variant and LDL, HDL, VLDL cholesterol and triglyceride levels with ischemic stroke and its subtypes. *J Neurol Sci*. 2012; 318(1-2): 51–4.
24. Rebhi L, Kchok K, Omezzine A, Kacem S, Rejeb J, Ben Hadjmbarek I. Six lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid profile and coronary stenosis in a Tunisian population. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(11): 9893–901.
25. Larson I, Hoffmann MM, Ordovas JM, Schaefer EJ, Marz W, Kreuzer J. The lipoprotein lipase HindIII polymorphism association with total cholesterol and LDL-cholesterol, but not with HDL and triglycerides in 342 females. *Clin Chem*. 1999; 45(7): 963–8.
26. Parfenov MG, Nikolaeva TY, Sudomoina MA, Fedorova SA, Guekht AB, Gusev EI. Polymorphism of apolipoprotein E (APOE) and lipoprotein lipase (LPL) genes and ischaemic stroke in individuals of Yakut ethnicity. *J Neurol Sci*. 2007; 255(1-2): 42–9.
27. Gambino R SL, Alemanno N, Pagano G, Cassader M. Human Lipoprotein Lipase HindIII Polymorphism in Young Patients With Myocardial Infarction. *Metabolism*. 1999; 48(9): 1157–61.
28. Anderson JL, King GJ, Bair TL, Elmer SP, Muhlestein JB, Habashi J. Association of lipoprotein lipase gene polymorphisms with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 33(4): 1013–20.
29. Wang XL, McCredie RM, Wilcken DE. Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene Association with severity of coronary artery disease and diabetes. *Circulation*. 1996; 93(7): 1339–45.
30. Georgiev A, Panov S, Sadikario S. Association of PvuII polymorphism in the lipoprotein lipase gene with the coronary artery disease in Macedonian population. *Prilozi*. 2008; 29(2): 213–25.