



CARDIOLOGÍA DEL ADULTO - REVISIÓN DE TEMAS

La apolipoproteína E: el polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos, los hábitos alimenticios y el origen étnico

Ana María García C., MSc.

Medellín, Colombia.

La apolipoproteína E (Apo E) es una proteína plasmática constituyente de las lipoproteínas, que tiene como función mantener la estructura y regular el metabolismo de varias de ellas. Los tres alelos más comunes del gen de Apo E son $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, los cuales producen tres isoformas de la proteína, llamadas E2, E3 y E4. Estos tres alelos diferentes son heredados en forma codominante dando como resultado seis genotipos: E2/2, E3/2, E3/3, E3/4, E4/4, E4/E2. El genotipo E3/E3 es el normal, con una frecuencia poblacional de 77%. Se ha estimado que 60% de la variación plasmática del colesterol está determinada genéticamente; el polimorfismo de Apo E corresponde a 14% de esas variaciones genéticas. La deficiencia de Apo E causa hipercolesterolemia severa. Genotipos específicos han sido implicados en el desarrollo de aterosclerosis, de enfermedad coronaria, de hiperlipoproteinemia tipo III (HLP tipo III), de enfermedad cerebrovascular y de formas familiares y esporádicas de enfermedad de Alzheimer.

Esta revisión muestra diferentes aspectos bioquímicos y genéticos de la apolipoproteína E, así como la relación de las diferentes formas de expresión genética de esta proteína con los cambios metabólicos de las lipoproteínas y con el origen étnico y los hábitos alimenticios.

Apolipoprotein E (Apo E) is a plasmatic protein, part of the lipoproteins; its function is to maintain the structure and regulate the metabolism of many different lipoproteins. The three most common alleles of Apo E gene are $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$, which produce three isoforms of protein E2, E3 and E4. This three alleles are inherited in a codominant way, resulting in six genotypes: E2/2, E3/2, E3/3, E3/4, E4/4, E4/E2. The normal genotype is E3/E3 and has a frequency of 77% in the general population. It has been estimated that 60% of the plasmatic cholesterol variation is determined genetically. Apo E polymorphism is responsible for 14% of the genetic variations. Apo E deficiency causes severe hypercholesterolemia, atherosclerosis and coronary heart disease. Specific genotypes have been implicated in diseases such as type III hyperlipoproteinemia (Type III HLP), coronary heart disease, stroke, and in sporadic forms of Alzheimer's disease.

This review shows different biochemical and genetic aspects of Apo E, its relationship with the different forms of genetic expression, and the effect of ethnic origin and of nutritional habits.

(Rev. Col. Cardiol. 2003; 10: 189-193)

Clínica Cardiovascular Santa María, Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Cardiovascular de Investigaciones, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Ana María García C. MSc, Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Cardiovascular de Investigaciones, Clínica Cardiovascular Santa María, Tel.: 442 22 00 Ext, 329, Medellín, Colombia. Correo electrónico: agarcia@congregacionmariana.org.co

Generalidades

La apolipoproteína E (Apo E) es una de varias proteínas que forman las lipoproteínas. Sus funciones incluyen el mantenimiento de la estructura de las partículas de apolipoproteínas y la regulación del metabolismo de las mismas a través de uniones de alta afinidad entre las apolipoproteínas que las contienen y los receptores de LDL celulares [apo b, E (LDL)]. Esta unión inicia la toma y degradación de las lipoproteínas que llevan al uso del colesterol de las lipoproteínas en la regulación del metabolismo intracelular del colesterol. Apo E comparte esta función con la apolipoproteína (1).

Se ha estimado que 60% de la variación plasmática del colesterol está determinada genéticamente, y el polimorfismo de Apo E corresponde a 14% de esas variaciones genéticas. Los genotipos específicos se han implicado en la hiperlipoproteinemia tipo III (HLP tipo III), en enfermedad coronaria, en enfermedad cerebrovascular y en formas familiares y esporádicas de enfermedad de Alzheimer (2).

La asociación del alelo $\epsilon 4$ con el incremento de riesgo de enfermedad coronaria, ha sido bien documentada. Se ha mostrado que el fenotipo de Apo E posee asociación significativa con este problema aun luego de la regulación de niveles lipídicos y de lipoproteínas en plasma, sugiriendo un incremento en el riesgo aumentado de enfermedad coronaria en los portadores del alelo $\epsilon 4$ que no sólo se explica por el efecto de los lípidos circulantes. El riesgo de desarrollar enfermedad temprana se asocia también a este alelo (1, 2).

Inicialmente, se llamó apoproteína rica en arginina y fue identificada por primera vez en 1973, como una lipoproteína constituyente de las VLDL, caracterizada en forma extensiva en diferentes especies animales. El gran interés en estudiar esta molécula surgió de las observaciones realizadas por Harvel y Kane en donde se encontró una acumulación de moléculas de VLDL y quilomicrones ricos en Apo E, en pacientes con hipercolesterolemia tipo III, desorden de origen genético, sugiriendo que Apo E juega un papel clave en el metabolismo del colesterol y de las VLDL (1).

La secuencia de aminoácidos de apo E obtenida en 1981, mostró que se trataba de un polipéptido de 299 aminoácidos que posee ocho secuencias consecutivas repetidas (*in tandem*) de 22 residuos de aminoácidos con naturaleza helicoidal anfipática, características que sugieren una relación con la unión a lípidos (2).

La estructura secundaria de Apo E consta de 62% de hélices α , 9% de hojas α , 11% de vueltas β y 18% de estructura aleatoria. Posee, además, hélices α anfipáticas (una cara con residuos polares y otra con residuos apolares), característica estructural de todas las apolipoproteínas y que es fundamental para la unión a los lípidos. La proteína posee dos dominios estructurales separados por la estructura aleatoria: la región aminoterminal (entre los aminoácidos 1 a 191) en la cual se encuentra el sitio activo, y la región carboxi-terminal con estructura típica de apolipoproteína, en donde se encuentra el sitio de unión a lípidos (1).

Polimorfismo en Apo E

El gen de la Apo E fue localizado en el cromosoma 19, cerca y ligado a los genes de Apo C1/CII. Este gen está formado por cuatro exones y tres intrones, con una extensión de 3.597 nucleótidos (2).

El locus del gen estructural de Apo E es polimórfico. Los tres alelos más comunes que se denominan $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, producen tres isoformas de la proteína llamadas E2, E3 y E4. Estos tres alelos son heredados en forma codominante dando como resultado seis genotipos: E2/2, E3/2, E3/3, E3/4, E4/4, E4/E2. Apo E3 es la isoforma de la proteína más común con una frecuencia de 77% en la población y contiene una cisteína en la posición 112 y una arginina en la posición 158. Apo E2, que posee la más baja frecuencia, se encuentra en el 8%-11% y contiene cisteína en ambas posiciones. Apo E4 se encuentra en 12% a 15% de la población y contiene arginina en ambas posiciones (2-4).

Métodos de detección del polimorfismo

Inicialmente, la caracterización fenotípica de las diferentes isoformas de Apo E, se basaba en la separación de estas moléculas del plasma sanguíneo con base en su carga neta utilizando la técnica del isoelectroenfoque (IEF) y visualizadas con tinciones para proteínas. El procedimiento de identificación de los isotipos se simplificó con la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa después del IEF y la visualización de las mismas por inmunotransferencia (immuno-blotting). Los métodos de fenotipificación por IEF, tienen la desventaja de poseer bajo poder discriminatorio y poca confiabilidad, haciendo que no se puedan distinguir variantes de apo E que tengan la misma carga neta (2).

Posteriormente y con la aparición de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR - *Polimerase Chain Reaction*), se logró el análisis genotípico de Apo E. Se han diseñado estrategias para desarrollar la PCR e identificar el polimorfismo de Apo E, de tal manera que amplifique secuencias que contengan tanto las variantes en secuencia de E2 como el E4, correspondiendo a los residuos 112 y 158. Para identificar los genotipos mayores (E2, E3, E4) se utiliza la amplificación por PCR de los fragmentos específicos y el tratamiento de mismos con enzimas de restricción específicas, seguida por la electroforesis en gel de agarosa (PAGE). La visualización de los fragmentos de ADN se realiza con tinción con bromuro de etidio o nitrato de plata. La Tabla 1 muestra una serie de mutaciones menos frecuentes que representan nuevos genotipos de Apo E y que han sido identificados por análisis de secuencia (2).

El polimorfismo y la afinidad por los receptores de LDL

Las LDL poseen dos tipos de receptores para Apo E: unos específicos y otros que reconocen también Apo B. La unión de las isoformas de Apo E al receptor, se da con una afinidad diferente, de modo tal que Apo E4 se une de una manera igual o un poco mayor que como lo hace Apo E3, mientras que la afinidad de Apo E2 es un 2% de la afinidad de E3. Esta interacción diferencial con los

receptores de lipoproteínas específicos, produce una variación de los niveles lipídicos y de lipoproteínas circulantes (2, 3).

La isoforma E4 tiene alta afinidad con las lipoproteínas ricas en triglicérido e induce una retoma más rápida de estas partículas por el hígado. Como consecuencia, el colesterol contenido en los hepatocitos se incrementa y el número de receptores de LDL es regulado negativamente, disminuyendo su número. Esto resulta en la disminución del catabolismo de la LDL plasmática y en el incremento de los niveles de colesterol unido a LDL (LDL-c). Esta relación se ha encontrado en individuos caucásicos homo (E4/E4) y heterocigóticos (E4/E3) para este alelo, y se asocia con elevados niveles de colesterol total y LDL, comparado con los niveles obtenidos con el alelo más común que es $\epsilon 3$ (2, 3).

El alelo de Apo $\epsilon 2$ tiene el efecto metabólico opuesto al descrito para el alelo $\epsilon 4$. Como la afinidad de E2 hacia los receptores es reducida, hay decremento de los niveles de colesterol contenido en los hepatocitos e incremento de los receptores de LDL por una regulación positiva, resultando en un aumento del catabolismo de las LDL del plasma y bajando el nivel del colesterol unido a LDL. Este alelo se asocia entonces a bajas concentra-

Tabla 1
ISOTIPOS DE APO E MENOS FRECUENTES

Isoforma	Cambio de AA	Unión al receptor	Frecuencia y efecto
E3	-	100%	75%, fenotipo normal
E2	Arg ¹⁵⁸ ⇌ Cys	<2%	10%, HLP III, aterosclerosis, ^{NS} TG, ^N LDL-c
E4	Cys ¹¹² ⇌ Arg	100 o mayor	15%, aterosclerosis, Alzheimer ^{NS} TG, ^N LDL-c,
E1	Lys ¹⁴⁶ ⇌ Glu	No conocido	HLP III
E1	Gly ¹²⁷ ⇌ Asp Arg ¹⁵⁸ ⇌ Cys	Aprox. 4	HLP III
E1	+2 Cys	No conocido	E1 (Bethesda), HLP III
E2	Arg ¹³⁶ ⇌ Ser	40	E2 (Christchurch), HLP III
E2	Arg ¹⁴⁵ ⇌ Cys	45	HLP III
E2	Lys ¹⁴⁶ ⇌ Gln	40	HLP III
E3	Inserción 121-127	25	E3 (Leiden) HLP III
E4	Leu ²⁸ ⇌ Pro	60	0.23%, Enfermedad coronaria, hiperlipidemias (IIa,IIb,IV yV)
E3	Ala ⁹⁹ ⇌ The Ala ¹⁵² ⇌ Pro	No conocido	No determinado
E3	Cys ¹¹² ⇌ Arg Arg ¹⁴² ⇌ Cys	<4	HLP III
E5	Cys ¹¹² ⇌ Arg Pro ⁸⁴ ⇌ Arg	100	No asociada a desórdenes lipídicos
E5	Glu ³ ⇌ Lys	Aprox. 200	Hiperlipidemia y aterosclerosis
E7	Glu ²⁴⁴ ⇌ Lys Glu ²⁴⁵ ⇌ Lys	No conocido	E7 (Suiza), hiperlipidemia, aterosclerosis, diabetes

ciones de LDL y colesterol total y al aumento en la concentración de triglicéridos, comparado con los niveles obtenidos con el alelo $\epsilon 3$ (2-4).

El polimorfismo de Apo E y su relación étnica

La frecuencia de alelos de Apo E varía también según el origen étnico. El alelo $\epsilon 4$ es considerablemente mayor en población afro-americana; en población caucásica está en los rangos reportados como normales, siendo del 14%, y en población hispánica de 10%, un valor levemente menor, pero sin significancia estadística. La frecuencia del genotipo E4/E4 disminuye con la edad y se sugiere que su relación con el incremento de LDL-c tiene un impacto negativo en la longevidad (5).

Para probar que el polimorfismo en Apo E está asociado con los lípidos plasmáticos en personas de edad y que el grado de asociación varía según la raza y el origen étnico, se realizó un estudio en el que se encontró que el polimorfismo en Apo E en poblaciones multiétnicas, es determinante en los niveles lipídicos del suero con efectos diferentes dependiendo del origen étnico. Por ejemplo, la presencia de $\epsilon 2$ se asocia a bajos niveles de LDL-c y baja en la tasa de colesterol total/HDL-c, pero el genotipo no afecta los niveles de HDL-c (5).

Otro estudio efectuado en una población rural de nativos americanos en donde se examinó la influencia genética de las variaciones en el *locus* del gen de Apo E en la variación de los niveles plasmáticos de lípidos, encontró una notable baja presencia del alelo $\epsilon 2$ (2.3%). No se encontraron diferencias en las concentraciones de LDL-c, entre los genotipos E3/E3 y E4/E3, y los portadores del genotipo E2/E3 tuvieron un decremento en estos valores. Con estos resultados concluyen que el alelo $\epsilon 4$ no tiene efecto en el incremento de los niveles de LDL-c en sociedades no occidentalizadas, y que los factores ambientales así como la dieta y el estilo de vida pueden disminuir la predisposición hipercolesterolémica resultante de la presencia del alelo $\epsilon 4$ (3).

En indígenas australianos en quienes se buscaron frecuencias alélicas para Apo E y su posible asociación con las concentraciones lipídicas, se encontró que la frecuencia alélica del genotipo E4/E4 fue significativamente mayor en estos individuos que la de un grupo control de población de ascendencia europea. Adicionalmente, se encontró que los indígenas de genotipo E4/E4, tendían a tener concentraciones más altas de triglicérido que aquellos con genotipos E3/E3 y E2/E3 (6).

El polimorfismo de Apo E y su relación con la dieta y el estilo de vida

La magnitud de influencia de los genotipos de Apo E en la respuesta a diferentes dietas e interacciones ambientales es controversial, y son varios los estudios en busca de este tipo de respuestas (7).

Para obtener una respuesta a dietas bajas en colesterol se realizó un estudio con pacientes de los genotipos E3/E3, E3/E4, E4/E4, los cuales fueron sometidos sucesivamente a tres tipos de dietas en el siguiente orden: primero una dieta estándar (38% de grasas y 300 mg de colesterol), luego una dieta modificada del NCEP (National Cholesterol Educational Program) (34% grasas y 265 mg de colesterol) y finalmente la dieta del NCEP con alto colesterol (43% grasas y 566 mg de colesterol). En los resultados se encontró que los diferentes genotipos difieren en la respuesta al colesterol total. Con la dieta NCEP hubo un decremento del -14.1% en sujetos con el genotipo E4/E4, y al elevar moderadamente la cantidad de colesterol ingerida (adición de 300 mg de colesterol), hubo un incremento del colesterol total en este grupo (10.4%), concluyendo que la respuesta es mayor en genotipos E4/E4 y que aun con una discreta elevación de la ingesta de colesterol se pueden encontrar elevaciones del 10% en el colesterol total del suero (8).

Otro estudio buscó la relación entre la respuesta de los genotipos de Apo E al tratamiento con dieta baja en colesterol (200 mg de colesterol día, durante un año), en pacientes con diabetes mellitus tipo 1. En los pacientes con al menos un alelo $\epsilon 4$ (Grupo E4), la línea base del colesterol total y el LDL-c, se encontraron incrementados comparado con el grupo del alelo $\epsilon 3$. La aplicación de la dieta resultó en una disminución similar en el colesterol en ambos grupos, y en el grupo E4 el colesterol total y el LDL-c disminuyó a niveles similares a los del grupo E3, con cambios mayores y estadísticamente significativos comparados con los del grupo E3. De esta manera, se encontró una asociación en las anomalías en lipoproteínas relacionadas con la aterogénesis y que los pacientes con alelos $\epsilon 4$ responden mejor a la dieta que aquellos portadores del alelo $\epsilon 3$ (9).

Para evaluar los efectos de los genotipos y de los ambientes de crianza en los niveles lipídicos, se estudiaron gemelos idénticos homocigóticos criados separados, comparándolos con gemelos criados juntos. Este trabajo y el desarrollado por Aguilar en 1998 en población rural de nativos americanos, muestran que los

factores ambientales así como la dieta y el estilo de vida, pueden jugar un papel importante en la variabilidad de los niveles lipídicos y en la predisposición hipercolesterolémica (3, 10).

Conclusiones

Apo E es una proteína de gran importancia en la regulación metabólica de las lipoproteínas así como en el transporte de lípidos desde diferentes tejidos y dentro de éstos. El elaborado sistema de almacenamiento, liberación y reutilización del colesterol dependen de una regulación coordinada entre la síntesis de Apo E y la expresión de los receptores de LDL celulares. El polimorfismo genético en Apo E resulta de la combinación de diferentes alelos que codifican proteínas que presentan sustitución en un único aminoácido, cambio que define a nivel celular y molecular el papel de esta proteína en el metabolismo normal y anormal de las lipoproteínas. De esta manera, la hipercolesterolemia tipo III que es asociada a aterosclerosis prematura, es efecto secundario de la presencia de una variante de Apo E, la cual no se une en forma normal al receptor celular de lipoproteínas y produce un metabolismo irregular y disminuido de las mismas.

El origen étnico es un factor determinante en la proporción de los genotipos. Es así como en la población afro-americana, $\epsilon 4$ se presenta con mayor frecuencia que en la población caucásica e hispánica, y el alelo $\epsilon 2$ se presenta en una proporción inusualmente baja en nativos americanos, viéndose con mayor frecuencia casos de hipercolesterolemia tipo III en este grupo.

Finalmente, los factores ambientales, el estilo de vida y los hábitos alimenticios pueden tener efecto sobre la

predisposición a la hipercolesterolemia resultante de la presencia del alelo $\epsilon 4$. La disminución en el contenido de colesterol consumido en la dieta, puede llevar a pacientes con alelos $\epsilon 4$ que presentan niveles altos de colesterol total, a decrementos sustanciales de estos niveles e incluso a niveles normales.

Bibliografía

1. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622-240.
2. Contois JH, Anamani DE, Tsongales GJ. The Underlying molecular mechanism of apolipoprotein E polymorphism. *Clinics in Laboratory Medicine: DNA technology* 1996;16(1):105-123.
3. Aguilar CA, Talavera G, Ordovas JM, Guillén LE, Leco ME, Botet JP, et al. The apolipoprotein E4 allele is not associated with an abnormal lipid profile in native american population following its traditional lifestyle. *Atherosclerosis* 1998;142(2):409-414.
4. Wu G, Yuan J, Hunninghake DB. Effect of human apolipoprotein E isoforms on plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 1998;141:287-296.
5. Pablos-Mendez A, Mayeux R, Ngai C, Shea S, Berlund L. Association of Apo E polymorphism with plasma lipid levels in a multiethnic elderly population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3534-3541.
6. Shaw JT, Tate J, Kesting JB, Merczak M, Berkholz JR, Lovelock PK, et al. Apolipoprotein E polymorphism in indigenous australians: allelic frequencies and relationship with dyslipidemia. *Med J Aust* 15;170(4):161-164 (Resumen de Medline).
7. Pasagian-Macaulay A, Aston CE, Ferrell RE, McAlister AE, Wing RR, Kuller LH. A dietary and behavioral intervention designed to lower coronary heart disease. Risk factors are unaffected by variation at the Apo E gene locus. *Atherosclerosis* 1997;132:221-227.
8. Sarkkinen E, Korhonen M, Erkkila A, Uusitupa M. Effect of apolipoprotein E polymorphism on serum lipid response to the separate modification of dietary fat and dietary cholesterol. *Am J Clin Nutr* 1998;68(6):1215-1222 (Resumen de Medline).
9. Blaauwwekel EE, Beusekamp BJ, Sluiter WJ, Hoogenberg K, Dullaart RP. Apolipoprotein E genotype is a determinant of low-density lipoprotein cholesterol and of its response to a low-cholesterol diet in Type 1 diabetic patients with elevated urinary albumin excretion. *Diabet Med* 1998;15(12):1031-5 (Resumen de Medline).
10. Kervinen K, Kaprio J, Koskenvuo M, Juntunen J, Kesaniemi YA. Serum lipids and apolipoprotein E phenotypes in identical twins reared apart. *Clin Genet* 1998;53(3):387-390.