



Biomédica

ISSN: 0120-4157

biomedica@ins.gov.co

Instituto Nacional de Salud

Colombia

Callas, Ney; Poveda, Elpidia; Baracaldo, César; Hernández, Patricia; Castillo, Carlina; Guerra, Martha
Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en un grupo de escolares del centro-oriente
colombiano: comparación con las concentraciones plasmáticas de lípidos y apolipoproteínas
Biomédica, vol. 27, núm. 4, diciembre, 2007, pp. 526-536
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84327408>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

ARTÍCULO ORIGINAL

Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en un grupo de escolares del centro-oriente colombiano: comparación con las concentraciones plasmáticas de lípidos y apolipoproteínas

Ney Callas¹, Elpidia Poveda¹, César Baracaldo¹, Patricia Hernández²,
Carlina Castillo¹, Martha Guerra²

¹ Grupo de Nutrición, Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo Clínico-Genético-Molecular en Dislipoproteinemias, Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Estudios mundiales han demostrado la contribución de los alelos de la apolipoproteína E en las variaciones de los lípidos y las apolipoproteínas.

Objetivo. Determinar la frecuencia alélica y genotípica de la apolipoproteína E y su asociación con los lípidos y apolipoproteínas en escolares de la región centro-oriental de Colombia.

Materiales y métodos. El tamaño de la muestra fue de 691 escolares entre los 5 y 15 años, de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Meta, Santander y Norte de Santander. Los genotipos de la apolipoproteína E se identificaron por reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud del fragmento de restricción. Se analizaron las variables lipídicas de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y colesterol VLDL, apolipoproteína A-I y apolipoproteína B-100.

Resultados. Las frecuencias de los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ fueron 0,04, 0,86 y 0,08, respectivamente. El grupo E4 (E4/3-E4/4) comparado con el grupo E2 (E3/2-E2/2) presentó las concentraciones plasmáticas más altas de colesterol total, colesterol LDL y apolipoproteína B-100 ($p=0,014$, 0,001 y 0,000, respectivamente), lo mismo ocurre al comparar el grupo E3/3 con el E2 ($p=0,015$, 0,002 y 0,002, respectivamente); la influencia del polimorfismo de la apolipoproteína E fue mayor en las niñas.

Conclusiones. La asociación del alelo $\epsilon 4$ con niveles más altos de colesterol total, colesterol LDL y apolipoproteína B-100 muestra la importancia de realizar otros estudios sobre el polimorfismo de la apolipoproteína E, su interacción con otros genes, estilos de vida y factores de riesgo y su posible contribución para el desarrollo de enfermedad cardiovascular.

Palabras clave: polimorfismo genético, apolipoproteínas, colesterol, triglicéridos, niño, adolescente.

Genetic polymorphism of the E apolipoprotein in school age children: comparison with levels of plasma lipids and apolipoproteins

Introduction. Research in laboratories around the world has documented the contribution of the E apolipoprotein alleles to structural variations of lipids and apolipoproteins.

Objective. The gene frequencies of the E apolipoprotein alleles were compared with the lipid and apolipoprotein levels in school age children.

Materials and methods. Six hundred and ninety one 5 to 15 years old school age children from the Colombian departments of Cundinamarca, Boyacá, Meta, Santander and Norte de Santander, were evaluated. The genotypes of the E apolipoprotein were identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Plasma levels for the following 5 lipids and lipoproteins were assayed: total cholesterol, HDL (high density lipoprotein) cholesterol, LDL (low density lipoprotein) cholesterol, triglycerides, VLDL (very low density lipoprotein) cholesterol, A-I apolipoprotein and B-100 apolipoprotein.

Results. Alleles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ were found in frequencies of 0.04, 0.86 and 0.08, respectively. The E4 group (E4/3-E4/4), in contrast with the E2 group (E3/2-E2/2), presented highest plasma

concentrations of total cholesterol, LDL cholesterol and B-100 apolipoprotein ($p=0.014$, 0.001 and 0.000 , respectively). When the E3/3 group was compared with E2, the same result was obtained ($p=0.015$, 0.002 and 0.002 , respectively). The influence of the E apolipoprotein polymorphism appeared greater in female children than male.

Conclusions. The $\epsilon 4$ allele was associated with higher levels of total cholesterol, LDL cholesterol and B-100 apolipoprotein and indicates the necessity of additional research into the interactions between polymorphism E apolipoprotein and other genes, life styles, risk factors and potential contribution to cardiovascular diseases.

Key words: polymorphism, genetic; apolipoproteins, cholesterol, triglycerides, child, adolescent.

La apolipoproteína E (ApoE) se encuentra en los quilomicrones, lipoproteínas de baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y en uno de los subgrupos de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La principal función de la ApoE es su interacción con los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (R-LDL) y el receptor relacionado al R-LDL (LRP); de esta forma, contribuye a la depuración de lipoproteínas ricas en triglicéridos y a definir los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol total (1-3). El *locus* del gen humano de la ApoE se encuentra en el cromosoma 19 (4); es un gen polimorfo con tres alelos codominantes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ que dan lugar a seis genotipos E2/2, E3/2, E3/3, E3/4, E4/4 y E4/2 (5). Los tres alelos difieren por la sustitución de nucleótidos en los codones 112 y 158, lo cual origina cambios en los aminoácidos en estas posiciones, dando la isoforma E2 que tiene cisteína; la E4, arginina, y la E3, cisteína en la posición 112 y arginina en la posición 158 (6).

La frecuencia de los alelos del gen de la ApoE varía considerablemente entre los diferentes grupos étnicos y puede ser un factor genético que contribuye a la variación de los niveles de los lípidos y lipoproteínas en la población (7). Los individuos con el alelo $\epsilon 4$ tienen un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares debido a que presentan niveles de colesterol total y colesterol LDL (C-LDL) más altos que los individuos con el alelo $\epsilon 2$ (7,8).

La mayoría de estudios sobre el polimorfismo de la ApoE y su asociación con los lípidos se ha realizado en población adulta, muy pocos han buscado esta asociación en la edad pediátrica y en población latinoamericana (9-13). Por esta razón, el propósito de este estudio fue determinar la distribución de los alelos y genotipos de la ApoE y la influencia de los diferentes genotipos sobre las variables lipídicas y apolipoproteínas (ApoA-I y ApoB-100) en un grupo de escolares de la región centro-oriental de Colombia (Cundinamarca, Boyacá, Meta, Santander y Norte de Santander) con edades comprendidas entre los 5 y los 15 años. El estudio se efectuó en estos departamentos considerando que en ellos existen altas tasas de mortalidad por enfermedad cardiovascular; según el archivo de defunciones del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), para 1999 la menor tasa de mortalidad por 100.000 habitantes para enfermedad cardiovascular por departamento se presentó en Vaupés con 20,5 y la mayor en Caldas con un 176,2; para Santander la tasa fue de 163,4, en Boyacá de 156,6, en Cundinamarca de 133,6, en Meta de 120,3 y en Norte de Santander de 119,9 (14,15).

Este es el primer trabajo publicado en Colombia que muestra la distribución alélica y genotípica de la ApoE y la influencia de los genotipos sobre las variables lipídicas y apolipoproteínas A-I y B-100 en escolares de la región oriental del país. Además, se hace una contribución al estudio de factores genéticos y ambientales que influyen a muy temprana edad las concentraciones de parámetros bioquímicos, lo cual es muy importante en la actualidad, debido a la evidencia que los niveles altos de CT y C-LDL se relacionan con los estados iniciales de la aterosclerosis en los jóvenes.

Correspondencia:

Elpidia Poveda, Avenida Calle 26 N° 51-20, zona 6, CAN, Bogotá, D.C.

Teléfono: 220 7700, ext. 303; fax: 220 7700, ext. 255
epoveda@ins.gov.co, epoveda1@yahoo.com

Recibido: 05/03/07; aceptado: 23/08/07

Materiales y métodos

Los resultados que aquí se presentan forman parte del proyecto "Caracterización de tipo ambiental y metabólico de riesgo cardiovascular en la población escolar de la región oriental de Colombia 2001-2003". Es un estudio observacional de corte transversal donde se evaluaron 691 escolares de la región centro-oriental de Colombia con edades comprendidas entre los 5 y los 15 años. La muestra corresponde al 47,4% de los 1.567 escolares seleccionados en el estudio del Instituto Nacional de Salud, en el cual se pretendía estudiar los factores que determinan la situación nutricional, el estado de salud y algunos aspectos socioculturales de los escolares colombianos entre 5 y 15 años que asisten a instituciones educativas públicas y privadas.

La muestra de 1.567 escolares seleccionada para la región del centro-oriente colombiano era representativa, aleatoria y estratificada (urbana y rural) de los escolares que asisten a los colegios públicos y privados de los cinco departamentos. La selección se basó en la población escolar matriculada en las instituciones públicas y privadas de la región, teniendo en cuenta sexo, edad, tipo de institución y zona. En cada departamento los municipios se seleccionaron de forma aleatoria y aquéllos que no aceptaron participar en el estudio se reemplazaron por otros que admitieron su ingreso. En la selección de los colegios se tuvo en cuenta la lista de los colegios públicos y privados provista por las secretarías de educación municipales; los colegios que no aceptaron participar se reemplazaron por otros que admitieron su ingreso al estudio. Se excluyeron de la muestra los colegios que no tenían el número de niños necesario por curso.

Los niños fueron visitados en las escuelas por un grupo interdisciplinario del área de la salud con el fin obtener información sociodemográfica y realizar la recolección de muestras de sangre. Bacteriólogas del Grupo de Nutrición del Instituto Nacional de Salud recolectaron las muestras de sangre en tubos al vacío y sin anticoagulante; la muestra se tomó con el niño en ayuno previo de 12 horas. Los sueros se separaron por centrifugación a 3.000 rpm dentro de las tres horas después de la toma

de las muestras, y se mantuvieron refrigerados durante el tiempo de transporte hacia el Instituto; los análisis de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas se realizaron seguidamente de finalizar la recolección de todas las muestras. Los glóbulos blancos fueron transferidos a tubos y congelados a -70°C mientras se analizaban.

Las concentraciones de colesterol total y triglicéridos se analizaron por pruebas enzimáticas colorimétricas (Serapak-Bayer). El colesterol HDL (C-HDL) se determinó en el sobrenadante por centrifugación, tras precipitación (quilomicrones, colesterol VLDL (C-VLDL) y C-LDL) con ácido fosfotúngstico e iones de magnesio (Serapak-Bayer). Los niveles de C-LDL y C-VLDL se calcularon mediante la fórmula de Friedewald cuando las muestras no tenían triglicéridos mayores de 400 mg/dl (16). Las determinaciones analíticas de los parámetros bioquímicos lipídicos se realizaron en el auto-analizador Selectra II Vitalab (Merck). Los niveles de las apolipoproteínas A-I (Apo-AI) y B-100 (ApoB-100) se determinaron por inmunoturbidimetría (Serapak-Bayer). Durante el procesamiento de las muestras se introdujeron controles internos de calidad normales y patológicos (Serachek-Bayer) para colesterol total, C-HDL, triglicéridos, ApoA-I y ApoB-100.

El polimorfismo de la Apo E se determinó a partir de la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los leucocitos por medio del método *salting out* (17). El genotipo de la Apo E se determinó por reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (PCR-RFLP, por sus siglas en inglés), utilizando la enzima de restricción *HhaI* (18).

Análisis estadístico

La estimación de las frecuencias alélicas se realizó mediante conteo alélico. El método de cadena de Markov se utilizó para comprobar si las frecuencias alélicas observadas estaban de acuerdo con las esperadas según la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg.

El promedio y la desviación estándar para la edad, lípidos plasmáticos, lipoproteínas y apolipoproteínas se analizaron en general y separadamente por sexo y en subgrupos de edades. Se utilizó el

análisis de varianzas (ANOVA) para comparar los lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas entre los grupos de edades y los genotipos de la ApoE, los cuales se agruparon de la siguiente forma: el grupo E2 (genotipos E2/2 y E3/2), el grupo E3 (genotipo E3/3) y el grupo E4 (genotipos E4/4 y E4/3). Los sujetos con genotipo E4/2 (n=3) fueron excluidos del estudio y únicamente se tuvieron en cuenta para estimar el efecto promedio. En los parámetros en los que se encontraron significancias entre los grupos se realizó el test de comparaciones múltiples de Scheffe. En todos los cálculos se trabajó con un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis se hicieron en el programa estadístico SPSS, tercera edición (19).

El impacto de los alelos ApoE sobre los lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas se determinó por el efecto promedio. El efecto promedio de los alelos E2, E3 y E4 se determinó por medio de las siguientes formulas (20):

$$\alpha_2 = \frac{f\mu_{22}\mu_{22} + 1/2f_{23}\mu_{23} + 1/2f_{24}\mu_{24} - \mu}{f\epsilon_2}$$

$$\alpha_3 = \frac{f_{33}\mu_{33} + 1/2f_{23}\mu_{23} + 1/2f_{34}\mu_{34} - \mu}{f\epsilon_3}$$

$$\alpha_4 = \frac{f_{44}\mu_{44} + 1/2f_{24}\mu_{24} + 1/2f_{34}\mu_{34} - \mu}{f\epsilon_4},$$

donde f_{22} a f_{44} representa la frecuencia de los genotipos (cuando se encuentran en equilibrio según la ley de Hardy-Weinberg); $f\epsilon_2$ a $f\epsilon_4$ constituye las frecuencias de los alelos; μ_{22} a μ_{44} es el promedio de cada variable lipídica en cada genotipo y μ representa el promedio general de cada variable lipídica. Para este análisis se utilizaron todos los genotipos con el perfil lipídico y apolipoproteínas, sin excluir ninguno y sin agruparlos (n=636).

Consideraciones éticas

La participación de los colegios y de los niños en el estudio fue voluntaria. El ingreso de los niños

fue previamente autorizado por el acudiente del niño mediante la firma del consentimiento informado. La investigación fue aprobada por los comités de ética de las instituciones ejecutoras del proyecto, Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud y Comité de Investigaciones de la Pontificia Universidad Javeriana, siguiendo los lineamientos de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y en concordancia con la declaración de Helsinki.

Resultados

La genotipificación se realizó en 691 escolares, el perfil lipídico (colesterol total, C-HDL, triglicéridos, C-VLDL y C-LDL) se determinó en 633 sujetos y la apolipoproteínas (A-1 y B-100) se determinaron en 660 individuos.

Las frecuencias alélicas relativas de los alelos ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 fueron 0,04, 0,86 y 0,08, respectivamente. Estas frecuencias están de acuerdo con las frecuencias esperadas según la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0,2276$). El genotipo más frecuente fue el E3/3 (74,6%) seguido por E4/3 (15,1%), E3/2 (7,9%), E4/2 (0,4%), E2/2 (0,3%) y E4/4 (0,3%) (cuadro 1). Las características del perfil lipídico según el genotipo de ApoE se observan en la cuadro 2.

Las concentraciones de colesterol total y C-LDL fueron significativamente más bajas en el grupo E2 comparado con E3 ($p=0,015$ y $0,002$, respectivamente) y E4 ($p=0,014$ y $0,001$, respectivamente). El C-HDL, los triglicéridos y C-VLDL no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos de la ApoE, pero se observó una tendencia en el grupo E2 a valores

Cuadro 1. Distribución de los genotipos de ApoE y la frecuencia alélica en escolares de la región centro-oriental de Colombia.

Genotipos	N	%	Alelos (frecuencia relativa)
E4/4	2	0,3	ϵ_2 (0,04)
E4/3	113	16,4	ϵ_3 (0,86)
E3/3	516	74,6	ϵ_4 (0,08)
E3/2	55	7,9	
E2/2	2	0,3	
E4/2	3	0,4	
Total	691		

Cuadro 2. Concentraciones promedio (\bar{X}) y desviación estándar (DE) de lípidos y apolipoproteínas, según categorías del genotipo de la ApoE en los escolares de la región centro-oriental de Colombia.

N= 633	Genotipo						P ANOVA
	\bar{X}	E2 51 DE	\bar{X}	E3 470 DE	\bar{X}	E4 112 DE	
Colesterol total (mg/dl)	138,3	39,4	151,1	28,3	153,1	28,9	**0,009
Colesterol-LDL (mg/dl)	77,1	33,6	91,3	25,2	94,4	26,3	†0,000
Colesterol-HDL (mg/dl)	43,9	11,8	43,3	10,8	41,6	9,0	0,276
Colesterol-VLDL (mg/dl)	17,2	8,0	16,5	7,0	16,9	7,7	0,712
Triglicéridos (mg/dl)	86,4	43,0	82,6	35,1	84,6	38,8	0,712
n=660		56		491		113	
ApoA-I	123,6	26,0	120,1	27,6	118,0	28,6	0,476
ApoB-100	67,1	16,0	75,6	16,0	79,2	18,2	‡0,000

Los grupos que presentaron diferencias significativas según Scheffe fueron los siguientes:

- ** para colesterol total: E2 Vs. E3 p=0,015, E2 Vs. E4 p=0,014
- † para colesterol-LDL: E2 Vs. E3 p=0,002, E2 Vs. E4 p=0,001
- ‡ para ApoB-100: E2 Vs. E3 p=0,002, E2 Vs. E4 p=0,000

más altos comparados con el E4. Se encontraron niveles más altos de Apo A-I en escolares con el genotipo E2, los cuales van disminuyendo en el orden E3>E4; sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas; la Apo B-100 mostró diferencias estadísticamente significativas con los valores más bajos en el grupo E2, comparados con el grupo E3 (p=0,002) y E4 (p<0,0001).

El efecto del polimorfismo de la ApoE sobre los lípidos y lipoproteínas se examinó por separado en los niños y en las niñas (cuadro 3). En los niños se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el C-LDL de los grupos E2 Vs. E3 (p= 0,001) y E2 Vs. E4 (p=0,002) con los niveles más bajos en el grupo E2 y los valores más altos en el grupo E4. Los niveles de ApoB-100 fueron significativamente más bajos en el grupo E2 que en el E3 (p=0,006) y E4 (p<0,000). Los niveles más altos de ApoA-I se observan en los niños del grupo E2 y decrecen en el orden E3>E4; no obstante, no se encontraron diferencias significativas. En las niñas se observó la influencia del genotipo de la ApoE en los niveles de colesterol total y C-LDL, los niveles fueron significativamente más bajos en las portadoras del genotipo E2

comparado con los genotipos E3 y E4. Para el colesterol total y el C-LDL, el nivel de significancia entre los grupos E2 y E3 fue p=0,004 y p=0,002, respectivamente, y para E2 vs E4 fue p=0,024 y p=0,012. Las concentraciones de ApoB-100 fueron más bajas en las niñas del grupo E2 comparadas con E3 (p=0,020). Las concentraciones más altas de ApoA-I se observan en las niñas del grupo E2 y decrecen en el orden E3>E4; sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. No se encontró ninguna relación entre los genotipos de ApoE y las otras variables lipídicas como el C-HDL, C-VLDL y triglicéridos.

Cuando se evaluó la influencia del genotipo de la ApoE por grupos de edad sobre los niveles de lípidos y lipoproteínas (cuadro 4), se encontró que las diferencias de colesterol total y C-LDL según el genotipo conservan una tendencia similar al comportamiento del grupo general, en el cual el E2 presenta los niveles más bajos para estos parámetros, comparado con el E4. Los valores más significativos se presentan en los grupos de edad de 5-6 y 13-15 años. Para el colesterol total y el C-LDL entre el genotipo E2 Vs. E4 el valor de p en el grupo 5-6 años fue de 0,017 y 0,005,

Cuadro 3. Genotipo de la ApoE, asociación con los niveles promedio (\bar{X}) y desviación estándar (DE) de lípidos y apolipoproteínas en los escolares de la región centro-oriental de Colombia según sexo.

N	Sexo	Genotipo							
		E2		E3		E4		P ANOVA	
		26 Niños	25 Niñas	216 Niños	254 Niñas	65 Niños	47 Niñas		
		\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE		
Colesterol total (mg/dl)	Niños	142,6	48,6	146,4	25,9	151,9	29,3	0,293	
	Niñas	134,7	27,3	155,1	29,6	154,7	9,3	*0,004	
Colesterol LDL (mg/dl)	Niños	79,7	42,2	86,0	22,9	93,8	24,8	**0,031	
	Niñas	79,5	22,5	95,7	26,2	95,4	28,2	†0,002	
Colesterol HDL (mg/dl)	Niños	46,5	12,9	44,4	11,6	42,0	9,8	0,175	
	Niñas	41,2	9,7	42,3	10,0	41,0	7,9	0,629	
Colesterol VLDL (mg/dl)	Niños	16,4	10,8	15,9	7,3	16,0	7,7	0,937	
	Niñas	17,4	5,5	17,0	6,7	18,1	7,6	0,556	
Triglicéridos (mg/dl)	Niños	82,4	54,0	79,5	36,8	80,0	38,6	0,937	
	Niñas	87,4	27,9	85,1	33,5	90,8	38,2	0,556	
N		28		227		65			
N		28		264		65			
ApoA-I (mg/dl)	Niños	126,5	28,7	121,9	28,4	120,3	33,9	0,646	
	Niñas	119,7	22,2	118,4	26,8	114,8	18,7	0,629	
ApoB-100 (mg/dl)	Niños	66,2	18,1	73,4	14,4	80,6	19,6	‡0,000	
	Niñas	68,1	13,4	77,4	17,0	77,3	15,9	¶0,019	

Los grupos que presentaron diferencias significativas según Scheffe fueron los siguientes:

- colesterol total:	Niñas	* E2 Vs. E3	p=0,004	E2 Vs. E4	p=0,024
- colesteol-LDL:	Niños	** E2 Vs. E3	p=0,001	E2 Vs. E4	p=0,002
- colesterol-LDL:	Niñas	† E2 Vs. E3	p=0,002	E2 Vs. E4	p=0,012
- ApoB-100:	Niños	‡ E2 Vs. E3	p=0,006	E2 Vs. E4	p=0,000
- ApoB-100:	Niñas	¶ E2 Vs. E3	p=0,020		

respectivamente y para el grupo de 13-15 años de 0,007 y <0,000.

Las concentraciones de Apo B-100 fueron significativamente más bajas en el genotipo E2 que en el E4 entre los grupos de edades de 5-6 años ($p=0,005$) y 13-15 años ($p=0,017$) y entre los genotipos E2 y E3 ($p=0,004$) en este último grupo de edad. En el grupo de 9-10 años la diferencia fue significativa únicamente en Apo B-100 entre los genotipos E2 y E3 ($p=0,032$).

Al estimar el efecto promedio de los tres alelos de la ApoE sobre los lípidos se observa claramente la influencia del alelo ϵ_2 en la disminución de las concentraciones de colesterol total (-13 mg/dL), C-LDL (-14 mg/dL) y ApoB-100 (-9 mg/dL). El alelo ϵ_4 presentó un efecto opuesto al presentado por el alelo ϵ_2 ; mostró unas concentraciones aumentadas de colesterol total (+2 mg/dL), C-LDL (+3 mg/dL) y ApoB-100 (+3 mg/dL) (cuadro 5).

Cuadro 4. Niveles promedio (\bar{X}) y desviación estándar (DE) de lípidos y apolipoproteínas según grupos de edad y genotipo de la ApoE, en escolares de la región centro-oriental de Colombia.

Grupos de edad y genotipos				Variables bioquímicas																	
				N		Colesterol total		C-LDL		C-HDL		C- VLDL		Triglicéridos		N		A-I		B-100	
				̄X	DE	̄X	DE	̄X	DE	̄X	DE	̄X	DE	̄X	DE	̄X	DE	̄X	DE	̄X	DE
5-6 años																					
E2	9	*116,1	36,1	**63,4	28,7	38,8	10,8	13,8	7,3	69,2	36,8	9	102,0	23,1	\$63,2	18,9					
E3	74	152,5	30,4	93,1	29,1	45,4	12,3	13,8	5,9	69,4	29,6	75	121,4	24,0	75,3	15,5					
E4	12	155,5	28,2	96,2	26,6	43,2	7,3	15,9	7,9	79,6	39,5	12	125,6	21,7	85,8	10,5					
7-8 años																					
E2	9	157,1	22,4	96,4	20,3	45,0	9,3	15,7	4,6	78,7	23,1	9	126,5	20,6	71,9	11,1					
E3	91	154,9	32,0	96,3	27,3	42,2	10,8	16,3	6,2	81,7	31,0	91	118,1	23,6	75,1	15,3					
E4	33	160,0	29,5	99,6	24,6	45,5	9,6	14,8	5,0	74,2	25,1	33	118,3	34,4	81,5	17,8					
9-10 años																					
E2	11	150,0	55,8	87,2	49,2	43,7	8,3	19,0	10,3	95,0	51,7	13	126,5	15,7	†65,5	15,8					
E3	73	157,2	25,9	97,9	20,5	43,9	10,7	15,4	5,1	77,1	25,8	75	126,6	27,5	76,8	13,7					
E4	11	152,0	29,0	92,3	32,5	40,7	8,2	18,9	6,4	94,5	32,1	11	109,9	14,1	76,8	14,5					
11-12 años																					
E2	14	149,5	31,4	84,5	24,9	45,7	17,1	19,1	9,9	95,7	49,7	14	134,6	35,2	72,6	15,6					
E3	116	153,3	25,2	90,6	23,3	44,7	11,1	17,9	8,7	89,8	43,5	120	118,1	34,3	74,9	19,3					
E4	30	154,7	32,8	95,8	30,7	39,7	8,6	19,1	9,2	95,9	46,2	30	122,1	30,2	79,1	24,0					
13-15 años																					
E2	8	‡109,5	17,0	¶48,6	13,5	45,5	7,2	15,3	8,3	76,6	41,6	8	116,2	16,0	¶¶57,7	5,7					
E3	116	141,2	25,2	82,6	23,2	41,1	9,1	17,5	6,9	87,7	34,8	122	118,6	25,0	75,9	14,5					
E4	26	141,5	20,4	86,5	18,4	38,5	8,4	16,5	8,6	82,6	43,4	27	112,8	25,1	74,7	14,2					

Los grupos que presentaron diferencias significativas según scheffe son los siguientes:

- Para colesterol total	Grupo de 5-6 años:	*	E2 Vs. E3	p=0,005	E2 Vs. E4	p=0,017
	Grupo de 13 a 15 años	‡	E2 Vs. E3	p=0,003	E2 Vs. E4	p=0,007
- Para colesterol-LDL	Grupo de 5-6 años	**	E2 Vs. E4	p=0,005		
	Grupo de 13-15 años	¶	E2 Vs. E3	p=0,000	E2 Vs. E4	p=0,000
- Para ApoB-100	Grupo de 5-6 años	§	E2 Vs. E4	p=0,005		
	Grupo de 9-10 años	†	E2 Vs. E3	p=0,032		
	Grupo de 13-15 años	¶¶	E2 Vs. E3	p=0,004	E2 Vs. E4	p=0,017

Cuadro 5. Estimación del efecto promedio (mg/dl) de los tres alelos comunes de ApoE sobre los lípidos plasmáticos, lipoproteínas y apolipoproteínas en escolares de la región centro-oriental de Colombia (n=636).

Alelos	Efectos promedio (a)						
	Colesterol total	Colesterol HDL	Colesterol LDL	Triglicéridos	Colesterol VLDL	ApoA-I	ApoB-100
ε2	-13,02	+0,90	-14,23	+1,75	+0,35	+3,11	-9,02
ε3	+0,42	+0,10	+0,39	+0,31	-0,05	+0,01	+0,12
ε4	+2,32	-1,33	+3,18	+2,19	+0,44	-1,43	+3,29

Discusión

La distribución alélica de la ApoE en esta cohorte de escolares ($\epsilon_2=0,04$, $\epsilon_3=0,86$, $\epsilon_4=0,08$) fue muy parecida a la encontrada en un estudio en niños españoles en el cual se reporta una frecuencia de los alelos ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 de 0,04, 0,87 y 0,09, respectivamente (21). Otros estudios en población europea mencionan una frecuencia del alelo ϵ_4 que varía entre 0,22 y 0,09 (22), estableciendo diferencias en la incidencia de enfermedades isquémicas cardíacas entre países de Europa (23).

En Latinoamérica se encuentran algunos estudios sobre la frecuencia de los alelos de la ApoE, los resultados son similares a los nuestros: en México un estudio en adolescentes mostró una frecuencia de $\epsilon_2=0,03$, $\epsilon_3=0,895$, $\epsilon_4=0,075$ (24); en Argentina se ha observado una frecuencia de $\epsilon_2=0,06$, $\epsilon_3=0,85$, $\epsilon_4=0,09$ (25); en Venezuela un estudio realizado en diferentes grupos de población demostró una distribución alélica de la ApoE para la población mestiza de $\epsilon_2=0,18$, $\epsilon_3=0,713$, $\epsilon_4=0,09$ (26) y en Brasil un estudio en niños demostró un ligero aumento en el alelo 4 ($\epsilon_2=0,06$, $\epsilon_3=0,77$, $\epsilon_4=0,17$) (27). Aunque se observan similitudes en la frecuencia alélica de nuestra población con la de estos grupos, se requieren otras investigaciones que incluyan mayor número de individuos de varias regiones del país para establecer si el comportamiento observado en este estudio se mantiene o si se modifica por otras variables que pueden influenciar el polimorfismo de la ApoE.

En este estudio la asociación del polimorfismo de ApoE con las diferentes variables lipídicas está de acuerdo con lo reportado en varias poblaciones, en las que se ha demostrado que el polimorfismo de la ApoE ejerce efectos sobre el perfil lipídico en los adultos pero también puede estar presente en la niñez (9,28,29). El alelo ϵ_2 se asoció con concentraciones bajas de colesterol total, C-LDL y ApoB-100 y el alelo ϵ_4 mostró las concentraciones más altas de estas variables. El alelo ϵ_4 ha sido asociado con un incremento de enfermedad coronaria pero su efecto puede variar de acuerdo con factores como el sexo, estilo de vida, etnia y ambiente (7,30).

Contrario a lo observado en colesterol total, C-LDL y ApoB-100 en los escolares de la región oriental no se encontró ninguna relación entre los genotipos de ApoE y C-HDL, C-VLDL, triglicéridos y ApoA-I; iguales resultados fueron obtenidos por Lehtimäki *et al.* (28,29), Steinmetz *et al.* (31) y Herrmann *et al.* (32).

En el presente estudio se encontró asociación del genotipo de la ApoE con los niveles de Apo B-100. En estudios realizados en muestras de sangre tomadas del cordón umbilical (31) y de niños recién nacidos (32) también se han demostrado diferencias en las concentraciones de ApoB asociadas al genotipo de ApoE. Los recién nacidos con el genotipo E2/2 tienen concentraciones más bajas de ApoB que los que tienen el genotipo E3/3. Aunque hoy en día las concentraciones elevadas de la Apo B-100 no se tienen en cuenta como un factor de riesgo cardiovascular, es importante recordar que la Apo B-100 es la única apolipoproteína que contiene la lipoproteína LDL, la cual está asociada a problemas cardiovasculares.

Al observar la influencia de los genotipos de la ApoE en niños y niñas por cada grupo de edad, el efecto del polimorfismo de la ApoE sobre variaciones en los lípidos fue más evidente en las niñas que en los niños. Resultados similares a los nuestros han sido reportados en estudios españoles, en los que encontraron que en las niñas existe asociación entre colesterol total, C-LDL y Apo B-100 según los genotipos de ApoE (22,33); sin embargo, otros estudios muestran que la variabilidad del genotipo de ApoE sobre el colesterol total y C-LDL es más significativa en los niños que en las niñas (9,11,28). Las diferencias en los resultados se pueden explicar posiblemente por las diferencias de edad que pueden influir en las medidas corporales (34) y en la dieta (35) de cada una de las cohortes seleccionadas en los estudios; es posible, también, la influencia de la diversidad étnica (9) y un efecto específico de sexo durante cierto periodo de la vida (36-38) del polimorfismo de la ApoE sobre estos parámetros.

En los grupos de edades de 5 a 6 y 13 a 15 años que tenían el genotipo E2, las concentraciones

de colesterol total, C-LDL y ApoB-100 fueron más bajas que en el grupo que tenía el genotipo E4; en los demás grupos de edades no hubo diferencias significativas, aunque sí se observó la misma tendencia. No obstante, son pocos los estudios en niños en los cuales se haya estudiado la influencia del genotipo de la ApoE según el sexo y grupo de edad. Estos resultados pueden deberse a cambios en el comportamiento de los lípidos en estas etapas de la vida, especialmente en la pubertad, cuando el efecto de la ApoE sobre el colesterol total y C-LDL y los cambios durante la adolescencia son bastante fuertes y pueden ser modificados por factores que afectan el crecimiento, la maduración y la función reproductora (39). En la etapa prepuberal a la cual pertenece el grupo de cinco a seis años, hay pocos cambios en las hormonas sexuales tales como la luteinizante y folículo estimulante; sin embargo, se evidenció la influencia del polimorfismo de la ApoE sobre el CT, C-LDL y ApoB-100.

El grupo de edad de 9 a 10 años presentó diferencias estadísticamente significativas únicamente en la ApoB-100, con las concentraciones más bajas en el genotipo E; Kurvinen *et al.* encontraron esta misma relación en niños de seis años (40). El efecto del polimorfismo de la ApoE únicamente sobre la apolipoproteína B-100 puede indicar el inicio de los cambios en las lipoproteínas que contienen esta apolipoproteína como las LDL, VLDL y remanentes de lipoproteínas, lo que puede llegar a afectar el metabolismo lipídico desde muy temprana edad.

El impacto de cada alelo sobre el promedio de los lípidos (41) en nuestra población escolar demostró que las concentraciones de colesterol total, C-LDL y la ApoB-100 disminuyeron entre quienes portaban el alelo ε2 y aumentaron entre quienes tenían el alelo ε4. Se puede decir que los individuos de este estudio que porten el alelo ε2 en alguno de los gametos heredados de los padres, tendrán un efecto promedio sobre la disminución del colesterol total, C-LDL y ApoB-100 de -13 mg/dl, -14 mg/dl y -9 mg/dl, respectivamente, de quienes no poseen este alelo; para los que tengan el alelo ε4 habrá un efecto promedio en el aumento de colesterol total, C-LDL y ApoB-100 de +2 mg/dl, +3 mg/dl y +3 mg/dl, respectivamente,

de quienes no lo tengan. El efecto promedio del alelo ε2 mostró disminución en las concentraciones de las variables lipídicas que se relacionan con riesgo cardiovascular (colesterol total, LDL-C y ApoB-100) y el del alelo ε4 mostró aumento de las concentraciones de estas variables.

Otros aspectos a tener en cuenta es que el polimorfismo de la ApoE afecta el microambiente de la región de unión con el receptor LDL que se encuentra entre los aminoácidos 136 y 150, el cambio de la arginina por cisteína en la posición 158 del alelo ε2 produce un cambio de la conformación que conlleva a la disminución del potencial electrostático que altera la unión de las lipoproteínas ApoE2 con el receptor LDL (42). Esto permite que el alelo ε2 presente una disminución en la unión con el receptor LDL con las lipoproteínas y, como consecuencia, una menor entrada de colesterol a la célula aumentando la producción de receptores LDL e incrementando la depuración de las lipoproteínas LDL, que conlleva a una disminución en las concentraciones de colesterol. En el alelo ε4 ocurre lo contrario, como existe una captación aumentada de las lipoproteínas por el receptor LDL se presenta una entrada incrementada de lipoproteínas y, por lo tanto, de colesterol a la célula; esto resultaría en una disminución en la síntesis de receptores LDL y, por lo tanto, menos captación de partículas LDL con una elevación del C-LDL (43). Nuestro estudio sustenta esta hipótesis, demostrándose un efecto del polimorfismo de la ApoE sobre este grupo de escolares en las variables lipídicas de colesterol total, C-LDL y ApoB-100, que se manifiesta en que la asociación del genotipo de la ApoE sobre los lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas plasmáticas puede ser debido en gran parte a la mediación de la ApoE en la remoción por los receptores del hígado de las lipoproteínas plasmáticas.

En conclusión, en el presente estudio se demostró que el efecto de la variación de los alelos del gen de la ApoE sobre las características lipídicas observada en los adultos, está también expresada en los escolares de 5 a 15 años de la región oriental de Colombia, presentando una asociación entre el alelo ε4 y mayores concentraciones de colesterol total, C-LDL y ApoB-100.

Esta circunstancia refuerza el interés por realizar otros estudios sobre el polimorfismo de la ApoE y su interacción con otros genes, estilos de vida y factores de riesgo para enfermedad cardiovascular que puedan determinar si realmente existe un impacto de este polimorfismo sobre el desarrollo de enfermedades crónicas, tales como la aterosclerosis.

Agradecimientos

Agradecemos a las instituciones de salud y educación departamentales y municipales que facilitaron y apoyaron el trabajo de campo para la recolección de la información; a los padres y niños participantes por su participación y paciencia.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no existen conflictos de intereses en la elaboración y ejecución de este proyecto.

Financiación

Este trabajo es parte del proyecto cofinanciado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" (Colciencias), titulado "Caracterización de tipo ambiental y metabólico de riesgo cardiovascular en la población escolar de la región Oriental de Colombia 2001-2003" (proyecto código 2104-04-11811). Además, recibió financiación por parte de la Pontificia Universidad Javeriana y el Instituto Nacional de Salud.

Referencias

1. **Chappell DA, Medh JD.** Receptor-mediated mechanisms of lipoprotein remnant catabolism. *Prog Lipid Res.* 1998;37:393-422.
2. **Ginsberg HN.** Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998;27:503-19.
3. **Mahley RW, Huang Y, Rall SC Jr.** Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res.* 1999;40:1933-49.
4. **Das HK, McPherson J, Bruns GA, Karathanasis SK, Breslow JL.** Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem.* 1985;260:6240-7.
5. **Mahley RW.** Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988;240:622-30.
6. **Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW.** Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem.* 1982;257:4171-8.
7. **Davignon J, Gregg RE, Sing CF.** Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1988;8:1-21.
8. **Hixon JE.** Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. *Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Arterioscler Thromb.* 1991;11:1237-44.
9. **Xu CF, Talmud PJ, Angelico F, Del Ben M, Savill J, Humphries SE.** Apolipoprotein E polymorphism and plasma lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels in Italian children. *Genet Epidemiol.* 1991;8:389-98.
10. **Srinivasan S, Ehnholm C, Wattigney W, Berenson GS.** Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipoprotein concentrations in black versus white children: The Bogalusa Heart Study. *Metabolism.* 1993;42:381-6.
11. **Porkka KV, Taimela S, Kontula K, Lehtimäki T, Aalto-Setälä K, Akerblom H et al.** Variability gene effects of DNA polymorphisms at the apo B, apo AI/CIII and Apo E loci on serum lipids: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin Genet.* 1994;45:113-21.
12. **Sanghera DK, Ferrell RE, Aston CE, McAllister AE, Kamboh MI, Kimm SY.** Quantitative effects of the apolipoprotein E polymorphism in a biracial sample of 9 -10-year old girls. *Atherosclerosis.* 1996;126:35-42.
13. **Okada T, Sato Y, Iwata F, Hara M, Kim H, Harada K.** Relationship of apolipoprotein E phenotypes to serum lipid and lipoprotein levels in Japanese schoolchildren. *Acta Paediatr.* 1998;87:460-1.
14. **Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de Salud.** Situación de salud en Colombia. Indicadores básicos. Bogotá D.C.: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de Salud; 2002.
15. **González M, De la Hoz F.** Mortalidad por enfermedades crónicas no transmisibles en Colombia, 1990-1999. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2002;14:209-36.
16. **Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS.** Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499-502.
17. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
18. **Hixon JE, Vernier DT.** Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res.* 1990;31:545-8.
19. **SPSS Inc.** SPSS-X users guide. 3d ed. Chicago: SPSS Inc.; 1988.

20. **Sing CF, Davignon J.** Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet.* 1985;37:268-85.
21. **Bercedo Sanz A, González-Lamuño D, Muñoz P, Albajar M, Rodríguez JC, Braga S, et al.** Asociación entre el perfil lipídico y genotipo de la apoproteína E en niños españoles (8-15 años). *An Esp Pediatr.* 1998;49:120-4.
22. **Bercedo-Sanz A, González-Lamuño D, Málaga S, García-Fuentes M.** Impact of apoE4 allele on total cholesterol levels of children in northern Spain. *Clin Genet.* 1999;55:69-70.
23. **Garcés C, Cantos M, Benavente M, Granizo JJ, Cano B, Vitorro E, et al.** Variations in APOE genotype distribution in children from areas with different adult cardiovascular disease mortality in Spain. *Hum Biol.* 2004;76:615-21.
24. **Medina-Urrutia AX, Cardoso-Saldana GC, Zamora-González J, Liria YK, Posadas-Romero C.** Apolipoprotein E polymorphism is related to plasma lipids and apolipoprotein in Mexican adolescents. *Hum Biol.* 2004;76:605-14.
25. **Sorroche P, Gutt LS, Brandi P, Oyhamburu JM, da Graca L.** Fenotipos de apolipoproteína E: frecuencia y relación con los lípidos en dadores de sangre. *Bioquím Pat Clin.* 1997;61:277.
26. **Fernández-Mestre MT, Yehirobi C, Montagnani S, Balbas O, Layrisse Z.** Genetic variability of apolipoprotein E in different populations from Venezuela. *Dis Markers.* 2005;21:15-9.
27. **De Franca E, Alves JG, Hutz MH.** Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipid levels in brazilian children. *Hum Biol.* 2004;76:267-75.
28. **Lehtimäki T, Moilanen T, Viikari J, Akerblom HK, Ehnholm C, Rönnemaa T, et al.** Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. *J Lipid Res.* 1990;31:487-95.
29. **Lehtimäki T, Porkka K, Viikari J, Ehnholm C, Akerblom HK, Nikkari T.** Apolipoprotein E phenotypes and serum lipids in newborns and 3-year-old children: the Cardiovascular in Young Finns Study. *Pediatrics.* 1994;94:489-93.
30. **Corella D, Guillén M, Sáiz C, Portolés O, Sabater A, Cortina S, et al.** Environmental factors modulate the effect of the APOE genetic polymorphism on plasma lipid concentrations: ecogenetic studies in a Mediterranean Spanish population. *Metabolism.* 2001;50:936-44.
31. **Steinmetz A, Thiemann E, Czekelius P, Kaffarnik H.** Polymorphism of apolipoproteína E influences levels of serum apolipoproteína E and B in the human neonate. *Eur J Clin Invest.* 1989;19:390-4.
32. **Herrmann W, Hanf S, Kaffarnik H, Motzny S, Reisner J, Steinmetz A.** The influence of apolipoprotein E polymorphism on plasma concentrations of apolipoprotein B and A-I during the first year of life. *Pediatrics.* 1994;93:296-302.
33. **Garcés C, Benavente M, Lasunción MA, Ortega H, Nájera G, de Oya M.** Gender-specific effects of apolipoprotein E genotype on plasma lipid levels in a population-based sample of 6-7-year-old children in Spain. *Acta Paediatr.* 2002;91:1039-43.
34. **Reilly SL, Ferrell RE, Kottke BA, Sing CF.** The gender-specific apolipoprotein E genotype influence on the distribution of plasma lipids and apolipoproteins in the population of Rochester, Minnesota, II: regression relationships with concomitants. *Am J Hum Genet.* 1992;51:1311-24.
35. **Mänttari M, Koskinen P, Ehnholm C, Huttunen JK, Manninen V.** Apolipoprotein E polymorphism influences the serum cholesterol response to dietary intervention. *Metabolism.* 1991;40:217-21.
36. **Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S, Ordovas JM, Schaefer MM, Castelli W, et al.** Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1105-13.
37. **Kamboh MI, Aston CE, Hamman RF.** The relationship of ApoE polymorphism and cholesterol levels in normoglycemic and diabetic subjects in a biethnic population from the San Luis Valley, Colorado. *Atherosclerosis.* 1995;112:145-59.
38. **Mahley RW, Palaoglu KE, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM, Cheung V, et al.** Turkish heart study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res.* 1995;36:839-59.
39. **Fulton JE, Dai S, Grunbaum JA, Boerwinkle E, Labarthe DR.** Apolipoprotein E affects serial changes in total and low-density lipoprotein cholesterol in adolescent girls: Project HeartBeat. *Metabolism.* 1999;48:285-90.
40. **Kurvinen E, Aasvee K, Zordania R, Jauhiainen M, Sundvall J.** Serum lipid and apolipoprotein profiles in newborns and six-year-old children: the Tallinn Young Family Study. *Scand J Clin Lab Invest.* 2005;65:541-50.
41. **Boerwinkle E, Sing CF.** The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. III. Simultaneous estimation of the frequencies and effects of the apolipoprotein E polymorphism and residual polygenic effects on cholesterol, betalipoprotein and triglyceride levels. *Ann Hum Genet.* 1987;51:211-26.
42. **Lund-Katz S, Wehrli S, Zaiou M, Newhouse Y, Weisgraber KH, Phillips MC.** Effects of polymorphism on the microenvironment of the LDL receptor-binding region of human apoE. *J Lipid Res.* 2001;42:894-901.
43. **Utermann G.** Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J.* 1987;113:433-40.