

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**"POLIMORFISMO DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEINA E
EN DISTINTAS POBLACIONES DE VENEZUELA"**

Trabajo de la asignatura de Trabajo de Grado para el grado de Licenciado en Bioanálisis de la Universidad de Carabobo

Autor(a):
Yehiroy Castro
Tutor(es):
Dra. Zulay Layrisse
Dr. Jorge Vargas
Asesor Metodológico:
Lic. Rosalina González

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

*Este Trabajo fue Evaluado por el Consejo de Exámenes
de Grado y Humanidades de la Universidad de Carabobo (COCHEHU) según
el Plan Número 1429-2003 de 17 de Octubre del 2003.*

**"POLIMORFISMO DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEINA E
EN DISTINTAS POBLACIONES DE VENEZUELA"**

*Tutor(a):
Código:
Fecha:*

*Tutor(a):
Código:
Fecha:*

*Trabajo de Investigación requisito de grado para optar por el título de
Licenciado en Bioanálisis de la Universidad de Carabobo.*

Valencia, 20 de Enero del 2004.

VALENCIA, ENERO, 2004

Este Trabajo fue Subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), según el oficio Número: 1425-2003 del 27 de Octubre del 2003.

Tutor(a): *ZULAY LAYRISSE*
C.I. V- 251389
Firma: *Zulay Layrisse*

Tutor(a): *JERGE VARGAS ARENAS*
C.I. V-1970516
Firma: *Jergé Vargas*

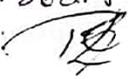
ACTA DE EVALUACIÓN

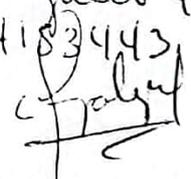
Este trabajo esta dedicado a la memoria de mis padres y a mi familia la cual me ha brindado el apoyo y animo necesario para alcanzar mis metas.

Los abajo firmantes, profesores miembros del personal Docente y de Investigación de la Universidad de Carabobo, hacemos constar que hemos actuado como jurado examinador del trabajo de investigación titulado: "Polimorfismo del Gen de la Apolipoproteína E en distintas poblaciones de Venezuela", realizado por la estudiante Yehiroby Castro, a que su asistencia

Luego de su evaluación, consideramos que reúne los requisitos de merito para su aprobación.

A toda aquella persona que creyó y confió en mí.

Nombre: Rosalva Gonzalez
C.I. 4866184
Firma: 

Nombre: Julio E. Gonzalez
C.I. 4183443
Firma: 

Observaciones: _____

DEDICATORIA

*** Este trabajo esta dedicado a la memoria de mis padres y a mi familia la cual me ha brindado el apoyo y animo necesario para alcanzar mis metas.

*** A mi hermano Santo por estar siempre, incondicionalmente y al cual le debo mi principal motivación.

*** A todos esos Profesores que me brindaron más que su asistencia educacional, su apoyo moral y su mano amiga.

*** A toda aquella persona que creyó y confió en mí.

RECONOCIMIENTO

*** Quiero darle gracias principalmente a Dios por brindarme su luz y cuidado durante la realización de este trabajo y por haberme puesto en mi camino a las personas ideales para su culminación.

*** Agradezco la colaboración principalmente de todo el personal del Laboratorio de Fisiopatología - Área Inmunogenética del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por brindarme acceso a sus instalaciones y ofrecerme su ayuda profesional.

*** Agradezco a la Dra. Mercedes Fernández de este mismo Laboratorio, por guiarme incondicionalmente en la realización de mi experimento y en resolver todas mis dudas.

*** Agradezco especialmente a mis tutores, Dra. Zulay Layrisse y Dr. Jorge Vargas Arenas, por brindarme su apoyo y confianza.

*** Agradezco también el apoyo económico brindado por el Centro de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH), y por el Laboratorio de Fisiopatología – Área Inmunogenética del IVIC.

*** Por último no puedo dejar de agradecer el alojamiento brindado por Anita y Delgy durante mi estadía en Los Teques.

INDICE O ÍNDICE

Tabla	Descripción	Página
Índice de Tablas	Distribución del Genotipo de 32 individuos de la Población indígena Yukno según la asignación tras visualización del ADN (obtenidas por medio PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etilo a través de luz UV.	viii
Índice de Gráficos		x
Resumen		xi
INTRODUCCION		1
Objetivo General	Distribución del Genotipo de 341 individuos de la Población indígena Bari según la asignación tras visualización del ADN (obtenidas por medio PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etilo a través de luz UV.	14
Objetivos Específicos		14
METODOLOGÍA		15
Tipo de Investigación		15
Población y Muestra		15
Procedimiento Metodológico		16
Análisis de los Datos		21
RESULTADOS Y DISCUSIONES		23
CONCLUSIONES		42
RECOMENDACIONES		44
BIBLIOGRAFIA		45
6	Frecuencia alélica y genotípica de la Apo E en 24 miembros indígenas Yukno	34
7	Frecuencia alélica y genotípica de la Apo E en 41 miembros indígenas Bari	34

INDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Distribución del Genotipo de 32 individuos de la Población Indígena Yukpa según la asignación tras visualización del ADN (obtenidos por medio PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.	23
2	Distribución del Genotipo de 341 individuos de la Población Indígena Barí según la asignación tras visualización del ADN (obtenidos por medio PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.	24
3	Distribución del Genotipo de 40 individuos de la Población de Curiepe según la asignación tras visualización del ADN (obtenidos por medio PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.	25
4	Distribución del Genotipo de 40 individuos de la Población de la Colonia Tovar según la asignación tras visualización del ADN (obtenidos por medio PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.	26
5	Distribución del Genotipo de 87 individuos de la Población Mestiza según la asignación tras visualización del ADN (obtenidos por medio PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.	27
6	Frecuencias alélicas y genotípicas de la Apo E en 32 individuos Indígenas Yukpa.	29
7	Frecuencias alélicas y genotípicas de la Apo E en 41 individuos Indígenas Barí.	30

INDICE DE GRAFICOS

Número del Gráfico	Descripción	Página
8	Frecuencias alélicas y genotípicas de la Apo E en 40 individuos de la Población de Curiepe.	31
9	Frecuencias alélicas y genotípicas de la Apo E en 40 individuos de la Población de la Colonia Tovar.	31
10	Frecuencias alélicas y genotípicas de la Apo E en 87 individuos de la Población Mestiza.	32
11	Distribución Porcentual General del Genotipo obtenido para las poblaciones Yukpa, Barí, Curiepe, Colonia Tovar y Mestizos de Venezuela.	33
12	Relación entre la presencia de los genotipos observados y esperados en los individuos en estudio de acuerdo al principio de Hardy-Weinberg en las poblaciones Yukpa, Barí, Curiepe, Colonia Tovar y Mestizos de Venezuela.	35
13	Comparación de las Frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas las poblaciones Yukpa, Barí, Curiepe, Colonia Tovar y Mestizos.	36
14	Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas con las frecuencias reportadas por poblaciones similares.	38
15	Frecuencias alélicas del gen de la Apo E determinadas por PCR-RFLP en las Poblaciones Mundiales.	40

RESUMEN

POLIMORFISMO DEL GEN DE LA "APOLIPOPROTEINA E" EN DISTINTAS POBLACIONES DE VENEZUELA.

Autor(a): Yehiroy Castro

Tutores: Dra. Zulay Layrisse y Dr. Jorge Vargas Arenas.

Asesor: Prof. Rosalina González

Realizado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Laboratorio de Fisiopatología, Caracas; en la Escuela de Bioanálisis y en la Unidad de Genética Médica y Citogenética, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia.

Financiado por el Centro de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), y el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

El Genotipo de la Apolipoproteína E fue investigado a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción Enzimática (PCR-RFLP) en cinco poblaciones de Venezuela, comprendida por 32 Indígenas Yukpa, 41 Indígenas Barí, 87 individuos Mestizos, 40 individuos de la Colonia Tovar y 40 individuos de Curiepe; con el objetivo de determinar su distribución y las frecuencias alélicas de dicha proteína. La frecuencia genotípica general obtenida fue la siguiente: E3/E3 (64,2%), E2/E3 (15,8%), E3/E4 (13,3%), E2/E4 (5%) y E4/E4 (1,7%). A partir de los genotipos se determinaron las frecuencias alélicas para compararlas posteriormente con aquellas frecuencias reportadas en otras poblaciones. Se observó una distribución de las frecuencias altamente heterogénea entre los grupos estudiados; el alelo e3 fue el más común, con frecuencias que variaron entre 0,922-0,713, seguido por el alelo e4 con frecuencias entre 0,150-0,078 y por último el alelo e2 con frecuencias entre 0,189-0,038 obtenidas en la mayoría de las poblaciones excepto en las Indígenas; comportamiento este muy similar al presentado en las etnias indígenas de Centro y Suramérica, que presentan bajas frecuencias o ausencia de dicho alelo. Los Mestizos Venezolanos presentaron frecuencias mayores para el alelo e2 con respecto a las reportadas por grupos similares, conservando la frecuencia del alelo e4; lo cual no ocurrió en el grupo de los Negros de Curiepe puesto que este alelo disminuyó considerablemente con respecto a las frecuencias reportadas para Afroamericanos y las frecuencias de la Colonia Tovar se mantuvieron relativamente parecidas a las reportadas en individuos de origen alemán.

Palabras Claves: Polimorfismo, Apolipoproteína E, Mestizos Venezolanos, Colonia Tovar, Curiepe, Indígenas Barí, Indígenas Yukpa.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se han realizado múltiples investigaciones acerca del genotipo de la Apolipoproteína E (Apo E), consecuencia de una posible participación de esta proteína en la fisiología neural, por sus altas concentraciones en diversas células del Sistema Nervioso Central y Periférico (Boyles,1985). También ha sido relacionada con la alteración de los lípidos plasmáticos debido al papel fundamental que juega dicha proteína en su transporte y metabolismo (Howard,1998; Mahley,1988; Robitaille,1996; Saito,2002). Recientemente una de sus variantes se considera un factor de riesgo importante en diversos tipos de demencias. Entre esas demencias se hace mucho hincapié en la Enfermedad de Alzheimer (EA) ya que una serie de estudios revelan una fuerte asociación entre la aparición de la enfermedad y la presencia de un alelo específico del gen que codifica la Apo E. (Caccuri,1998; De-Andrade,2000; Falcon,1998; Martínez,2001; Molero,2001; Reich,1999).

El gen que codifica para la Apolipoproteína E (Apo E) se encuentra en el cromosoma 19, dicho gen tiene 3,7 kilobases de longitud y es altamente polimórfico presentando tres alelos comunes definidos como e2, e3, e4. Su ARN-m es de 1163 pares de bases de longitud, el cual se traduce formando un primer producto compuesto por 317 aminoácidos (a:a) y conformando finalmente una proteína de 299 a:a con un peso molecular de 34000 daltons (Caccuri,1998; Mahley,1988; Utermann,1980). La estructura secundaria de la Apo E se basa en el modelo de Chou Fasma (Fig. 1), constituida por las formas hélice α , lámina β , giro β y estructuras al azar; con una proporción de 62%, 9%, 11% y 18% respectivamente de estas formas espaciales. Esta característica le permite unir lípidos, razón por la cual es denominada proteína lipofílica y se encuentra formando parte de las lipoproteínas como

por ejemplo la VLDL (Lipoproteína de muy baja densidad), la HDL (Lipoproteína de alta densidad), y los Quilomicrones, bien sea formando parte de su estructura o cumpliendo funciones biológicas como la secreción, el proceso, la regulación o el catabolismo de las mismas (Fig. 2). Por otro lado, esta estructura permite la conformación de dos dominios, entre los residuos 140 al 160 aproximadamente, para la interacción con el receptor de las LDL (Lipoproteína de baja densidad) presente en la superficie de las células hepáticas (Fig. 3). Sustituciones de los aminoácidos (aa) nativos de este dominio específicamente en los residuos 142, 145, 146 y 158, hace que se modifique la interacción receptor-dominio.

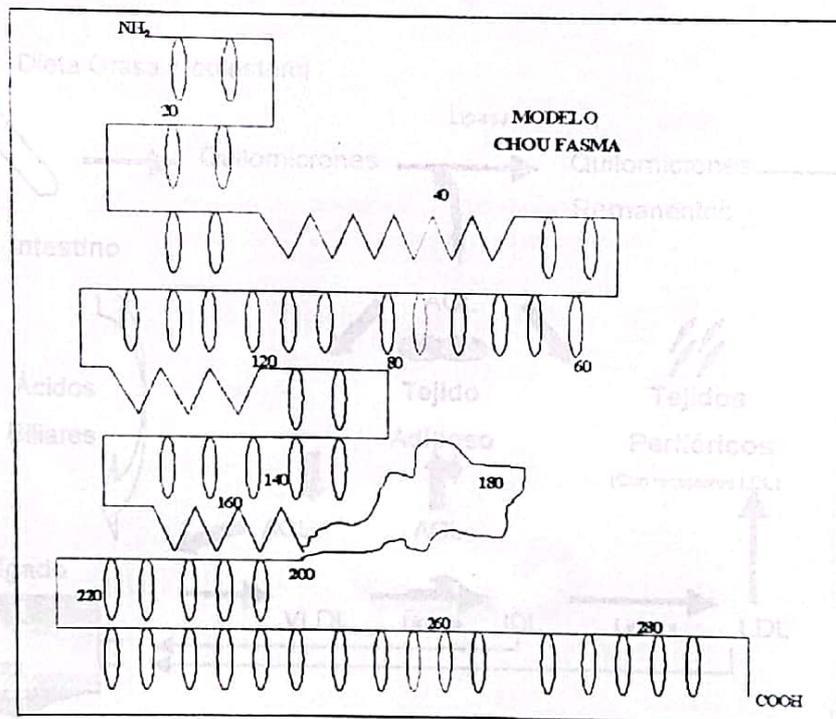


Fig. 1: Estructura Secundaria de la Apo E. (Mahley, 1988)

Estas sustituciones se involucran directamente con la expresión final de uno de los tres alelos comunes de la Apo E ya descritos, los cuales finalmente producen alguna de las isoformas de esta proteína según su expresión; por ejemplo, cuando se expresa el alelo e2 la isoforma que se produce es la Apo E2, la codificación de esta proteína varía en algunas

bases nucleicas con respecto a las otras, trayendo esto como consecuencia la sustitución de a:a nativos que conforman dicha proteína; en este caso estos a:a sustituidos se ubican a nivel del dominio de la proteína, produciéndose un cambio espacial en la conformación del mismo por la presencia de los nuevos a:a. Debido a que este dominio permite el reconocimiento de las lipoproteínas por los receptores de las células hepáticas para el catabolismo de los lípidos circulantes en sangre, al estar modificada su estructura, no es reconocido por dichos receptores y por lo tanto los lípidos continúan circulando en sangre. (Mahley, 1988).

aproximadamente en una proporción de 1/3 de lo presente en el intestino.
 (Mahley 1988)

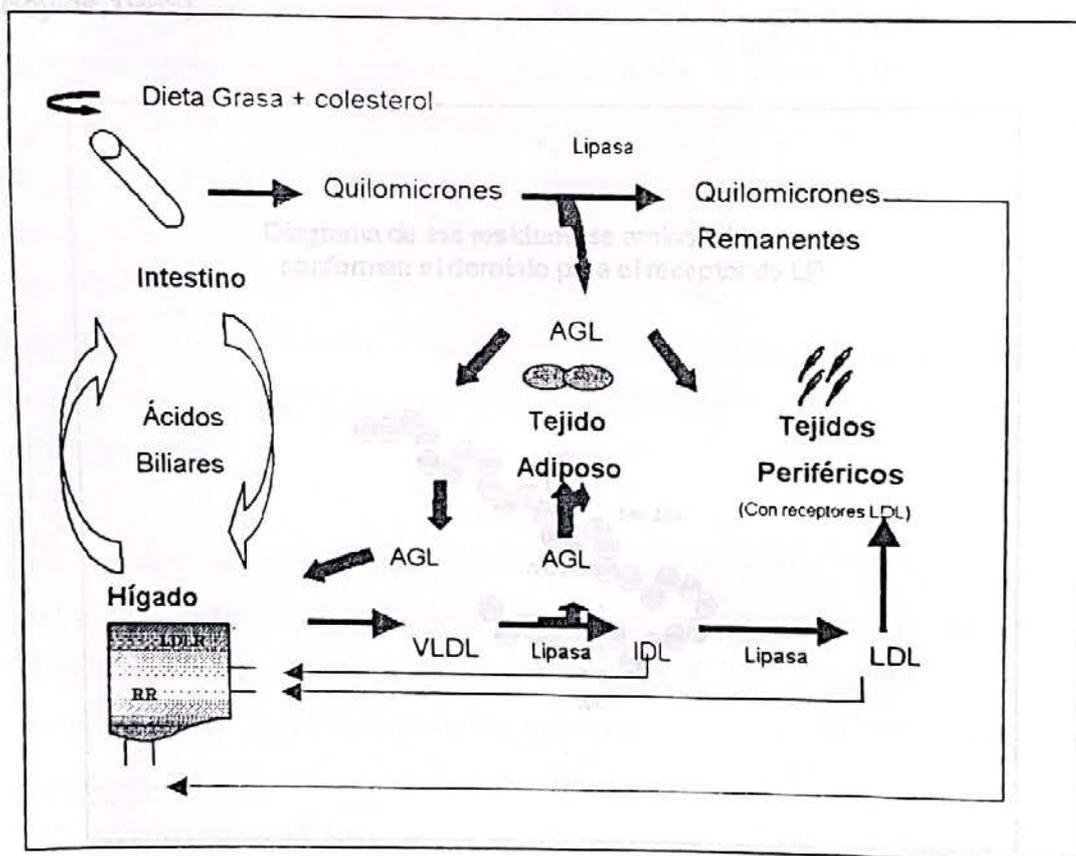


Fig. 2: Esquema general del Metabolismo de Quilomicrones. VLDL, IDL, LDL, y Quilomicrones Remanentes (AGL: ácidos grasos libres; LDLR: receptor de lipoproteínas; RR: receptores de Remanentes). (Mahley 1988).

La Apo E es sintetizada por diversos órganos, su ARN mensajero (ARN-m) ha sido encontrado en cantidades significativas en el hígado, cerebro, bazo, pulmón, glándulas suprarrenales, ovario, riñón y músculo. De todos estos órganos es en el hígado donde se ha encontrado la mayor cantidad de este ARN-m, por lo cual es considerado la principal fuente de Apo E, comprendiendo 2/3 o 3/4 partes de la concentración en plasma la cual es de 5 mg/dL; siendo las células del parénquima hepático las responsables de su producción (Mahley,1988). La segunda concentración mayor de ARN-m de la Apo E se encuentra en el cerebro, aproximadamente en una proporción de 1/3 de la presente en el hígado (Boyles,1985).

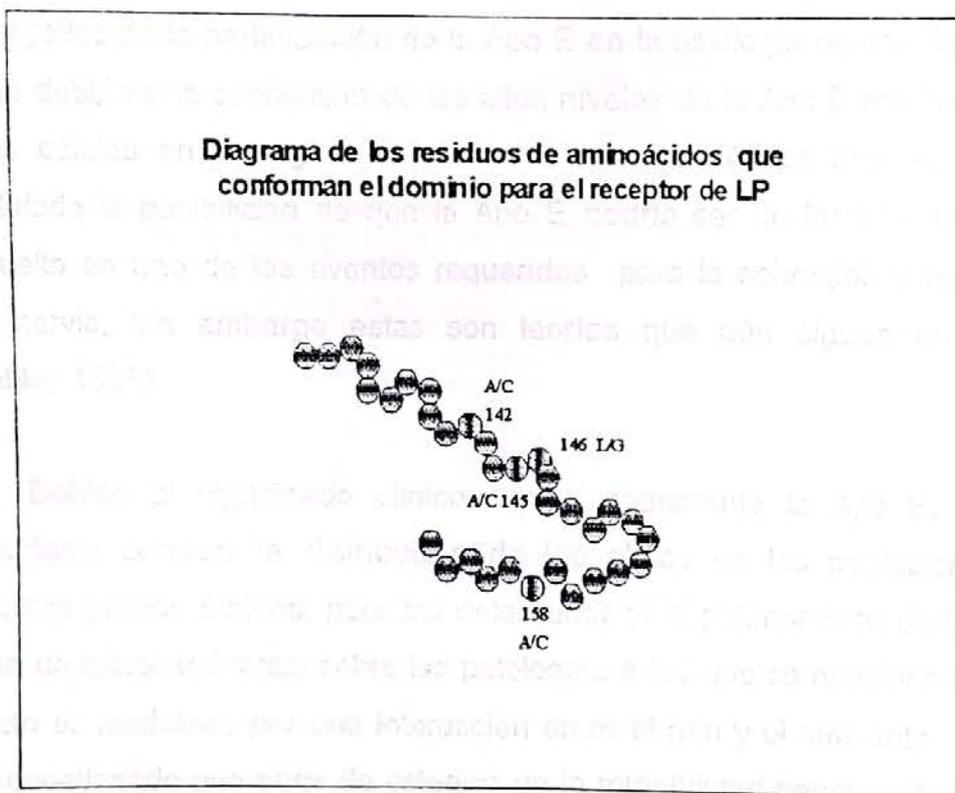


Fig.3: Diagrama de los residuos de Aminoácidos de la Apo E próximos al dominio que se unirá al receptor. Los Residuos involucrados en la posición 140 a 160 constituyen el sitio responsable de la unión de la Apo E a los receptores de las lipoproteínas. (Mahley, 1988).

La presencia de Apo E en las células de diversos tejidos indica la importancia de ésta en el transporte de lípidos y posiblemente en otros papeles aún no identificados. En este sentido, recientemente se ha descubierto que la producción de Apo E puede estar modulada por el estado de activación de los macrófagos, por ejemplo ante una estimulación marcada por una endotoxina se produce una disminución en la síntesis de Apo E. Por lo tanto, además del transporte de lípidos, la Apo E cumpliría un posible papel como inmunoregulador. Probablemente el ARN-m de la Apo E que se ha observado en pulmón y bazo sea responsabilidad de los macrófagos presentes en estos tejidos, sin embargo no puede excluirse la síntesis de Apo E en estos tejidos. También se cree que los macrófagos, involucrados aparentemente en la regeneración del tejido nervioso periférico, son los encargados de la participación de la Apo E en la fisiología neural. Esta teoría surge debido a la asociación de los altos niveles de la Apo E producidos por estas células en la región distal de los nervios ciáticos (Fig. 4). Se ha postulado la posibilidad de que la Apo E podría ser un factor neurotrópico envuelto en uno de los eventos requeridos para la sobrevivencia y reparación del nervio, sin embargo estas son teorías que aún siguen en estudio (Mahley, 1988).

Fig. 4. Falta de Apo E en la regeneración del tejido nervioso periférico.

Debido al significado clínico que representa la Apo E, es muy importante conocer la distribución de los alelos en las poblaciones de diversos grupos étnicos, para así determinar si el polimorfismo de la Apo E tiene un efecto universal sobre las patologías a las que se relaciona o si este efecto es modulado por una interacción entre el gen y el ambiente. Esto ha desencadenado una serie de estudios de la variabilidad genética de la Apo E que intentan obtener una información completa sobre las frecuencias de los alelos del gen en poblaciones alrededor del mundo.

En este sentido Gerdes (1992), realizó un estudio comparativo para determinar el polimorfismo de la Apo E en 466 hombres de origen Danés de aproximadamente 40 años de edad; la frecuencia alélica obtenida fue de 0,085 para el e2, 0,741 para el e3 y 0,174 para el e4. Dicho estudio fue de suma importancia puesto que logro reunir la frecuencia reportada en 45 poblaciones previamente estudiadas alrededor del mundo, y se determina de esta manera que la frecuencia del e4 parece ser más alta en regiones nor-europeas que en las sur-europeas.

De igual manera Evans (1993), analizó el polimorfismo de la Apo E en un grupo de individuos sanos de Taiwán pero con la finalidad de relacionarlos con los niveles de lípidos en el plasma debido a la asociación de los alelos e2 y e4 con el incremento y el descenso de la VLDL y el colesterol plasmático respectivamente. Las frecuencias alélicas obtenidas fueron similares a las reportadas por otras poblaciones Asiáticas, e2: 0,074, e3: 0,844 y e4: 0,082.

Retornando a las poblaciones Europeas, Corbo (1995), estudió este polimorfismo pero en las poblaciones del centro y sur de Italia. Las frecuencias observadas para los alelos e2, e3 y e4 fueron similares entre los dos grupos: 0,066, 0,851, 0,083 y 0,056, 0,858, 0,085 respectivamente. En la población de Cerdeña se observó que las frecuencias del gen de la Apo E, e2 (0,050), e3 (0,898) y e4 (0,052), eran significativamente diferentes de aquéllas del resto de Italia, siendo la frecuencia de e4 una de las más bajas entre las poblaciones Caucásicas. Las frecuencias se compararon con aquellas encontradas en otras poblaciones europeas, observándose un claro descenso de las frecuencias del alelo e4 del Norte al Sur y una tendencia opuesta para las frecuencias de e2 y e3.

Guerrero (1995), determinó el genotipo Apo E en 100 individuos de la población mestiza mexicana sana obteniendo 80% para E3/3, 13% para E3/4, 6 % para E2/3 y 1 % para E2/4. Las frecuencias alélicas correspondientes fueron e3 0,895, e4 0,070 y e2 0,035, es decir que el genotipo de mayor frecuencia es el E3/3 y el de menor frecuencia E2/2, en cuanto a los alelos destaca que el e3 presento resultados similares a los encontrados en otras poblaciones. Entre las conclusiones más importantes subraya que es importante que estos estudios se realicen también en pacientes con EA para así establecer comparaciones con las frecuencias en la población sana y poder determinar si la variación genética en el locus de la Apo E en las poblaciones humanas representa o no un factor de riesgo de padecer esta enfermedad.

También Cariolou (1995), investigó el polimorfismo del gen de la Apo E en 355 Chipriotas griegos no relacionados. Los genotipos obtenidos a través de PCR y la enzima de Restricción HhaI, siguió el modelo de los Caucásicos Europeos que poseen altas frecuencias del genotipo E3/3, seguido por E3/4 y E2/3. Sin embargo la frecuencia del genotipo E3/4 ha sido la más baja reportada en Europa. El hecho más destacado fue que las frecuencias relativas de los alelos e2 y e4 en esta población se encuentran entre las más bajas (después de la de Cerdeña) 0,053 y 0,070 respectivamente, siendo este comportamiento muy similar en las poblaciones del sur de Europa y Japón que tienen frecuencias bajas para e2 y e4.

Robitaille (1996), estudió la población de Québec cuyos habitantes son descendientes de Canadienses y Franceses. Este estudio comprendió, además del polimorfismo de la Apo E, los efectos que pudiera tener éste sobre los niveles de lípidos y lipoproteínas de la sangre, por lo que se consideraron variables como edad, altura, peso y estado pre y post

menopáusicas en mujeres. La frecuencia alélica fue 0,137, 0,749 y 0,114 para los alelos e2, e3 y e4, respectivamente. Los sujetos con e2 presentaron bajos niveles de colesterol total y LDL, en cambio las mujeres postmenopáusicas y hombres con e4 en algunos de sus haplotipos presentaron niveles altos de estos mismos lípidos. Aunque el impacto del polimorfismo de la Apo E en los niveles de lípidos y lipoproteínas en la sangre en esta población es similar a lo reportado en otras poblaciones caucásicas, la frecuencia del alelo e2 es una de las más altas hasta ahora reportada. Este hallazgo aún se discute y se le atribuye al efecto fundador que caracteriza a la población de Québec.

American Journal of Human Genetics, 58: 1073-1078

0,12 Uno de los estudios más grandes y que ha aportado datos importantes a este tema fue el realizado por Farrer y col. (1997), quienes examinaron los efectos de la edad, sexo y etnia en la asociación entre el genotipo de la Apo E y la Enfermedad de Alzheimer. Este estudio comprendió poblaciones de varias denominaciones étnicas y raciales tales como Caucásicos, Afroamericanos, Hispanos y Japoneses, entre otros; para un total de 8607 individuos sanos o controles y 5930 pacientes diagnosticados con EA. Se determinaron las frecuencias de los alelos e2, e3 y e4 y los 6 genotipos correspondientes de la Apo E. En el caso de los controles, la frecuencia del alelo e3 en las cuatro poblaciones estuvo entre 0,727 y 0,869, mientras que la frecuencia de los alelos e2 y e4 varió según el grupo, siendo la más baja la reportada en los japoneses (e2: 0,042 y e4: 0,089), con respecto a la reportada en Caucásicos y Afroamericanos (e2: 0,083-0,084 y e4: 0,137-0,190, respectivamente). En el grupo control de los Hispanos se observó una frecuencia intermedia de e2 (0,067) y e4 (0,110). En cuanto a los resultados de los genotipos, la frecuencia reportada fue comparable a la presentada por los alelos. La influencia de las variables sexo, edad y etnia en la enfermedad se evaluó por medio de métodos estadísticos; obteniéndose las siguientes conclusiones; el alelo e4 representa un factor de riesgo para la EA en todos

los grupos étnicos estudiados, principalmente en las edades comprendidas entre los 40 y 90 años, tanto en hombres como en mujeres. La asociación entre el alelo e4 y la EA en los Afroamericanos requiere una clarificación, y el efecto claro de e4 en Hispanos debe ser investigado.

Continuando con los estudios realizados en este continente, Gamba (2001) De igual manera Howard (1998), realizó un amplio estudio comparativo formado por 3405 sujetos jóvenes de origen distinto, Afroamericanos y Blancos, que residían en Estados Unidos, con el fin de investigar el polimorfismo de la Apo E. Los resultados mostraron frecuencias elevadas de los alelos e2 y e4 (0,131 y 0,201 respectivamente) en hombres y mujeres Afroamericanos con respecto a la observada en los Blancos, (e2: 0,076; e4: 0,121); por el contrario las frecuencias de e3 en Blancos fue mayor, (0,800) con respecto a los Afroamericanos (0,668).

Recientemente se han realizado diversos estudios en Latinoamérica para evaluar como se distribuye la frecuencia de los alelos de la Apo E en las distintas poblaciones en estos países, entre ellos resaltan Brasil y México. De Andrade (2000), estudió las frecuencias del gen de la Apo E en 186 individuos de seis tribus Indígenas de Sudamérica, en las cuales se observó la presencia de los tres alelos comunes de la Apo E e2, e3 y e4 con una distribución heterogéneamente elevada, específicamente la frecuencia del alelo e4 (0,47) reportada en las tribus Wai Wai. Como en otras poblaciones el alelo e3 es el más común, 0,51-0,88, seguido por e4, 0,02-0,47. Ambas isoformas fueron determinadas en todas las tribus, pero el alelo e2 sólo se observó en las tribus Wai Wai, 0,02, y Mataco, 0,04. En otro estudio De Andrade (2000) retornó a investigar el polimorfismo de la Apo E, pero con el fin de determinar si existía alguna asociación con los lípidos del plasma y la Enfermedad de Alzheimer en una población de Porto Alegre al sur de Brasil. La muestra consistió de 446 individuos, entre ellos 100 Caucásicos y 100 Afro-brasileros, no relacionados cuyos genes se analizaron por medio de

PCR y digestión con la enzima de restricción HhaI. Las frecuencias de los alelos e2, e3 y e4 fueron de 0,075, 0,810 y 0,115 en Caucaśicos y 0,075, 0,700 y 0,225 en los Afro-brasileros, respectivamente.

Continuando con los estudios realizados en este continente, Gamboa (2001), investigó la influencia del polimorfismo de la Apo E en las lipoproteínas del plasma de 278 individuos Mexicanos. La frecuencia más elevada fue para el genotipo e3/3 (80,5%) seguida por e3/4 (12,5%), e2/3 (5%) y e3/4 (1,4%). En cuanto a las frecuencias alélicas para el e2, e3 y e4 fueron de 0,032, 0,893 y 0,073 respectivamente. Estos datos fueron similares a los descritos previamente en la poblaciones Mexicoamericanas y en Indios Americanos; mostrando altas frecuencias del alelo e3 y del genotipo e3/3 descrita mundialmente.

En Venezuela solo Molero (2001) ha analizado y reportado hasta ahora las frecuencias alélicas del gen de la Apo E en tres grupos de individuos de la población de Maracaibo: pacientes con Alzheimer, pacientes con Demencia Vascular y un grupo de individuos de esa región sanos de origen mestizo, las frecuencia obtenidas en el grupo control fueron e2, 0,05; e3, 0,84; y e4, 0,11.

No obstante, en este país no se han realizado investigaciones exhaustivas considerando las distintas etnias que conforman esta población, ya que solo refiriéndonos a las etnias indígenas, de los 30 grupos que aproximadamente existen, la mayoría se encuentran distribuidos en las regiones fronterizas del país como por ejemplo, los Barí o los Yukpa ubicados en la frontera del Zulia distribuidos en varios sitios de la Sierra de Perijá, los Yanomami y Makiritare en el estado Amazonas, los Warao en el Delta del Orinoco, etc. (Arends, 1992; Díaz, 1976)). Además Venezuela se caracteriza por la presencia de poblaciones y/o colonias extranjeras de

diferentes orígenes étnicos, por ejemplo la Colonia Tovar en el estado Aragua habitado principalmente por individuos de origen Alemán, y Curiepe en el estado Miranda donde predomina la mezcla con descendientes de Africanos (Chacón,1979;Guedez,1991). En ambos tipos de poblaciones el nivel endogámico es variable por lo que nos pareció interesante plantear un estudio de la expresión de sus genes y compararlo con estudios en poblaciones similares, permitiendo esto una investigación desde puntos de vista distintos. De igual manera estudiar la población mestiza aportaría importantes datos puesto que aproximadamente más del 80% de la población Venezolana esta comprendida por este grupo.

Ante tal situación se formulan las siguientes interrogantes: ¿Cuál es la distribución de los genotipos de la Apo E presentes en individuos sanos de Venezuela? ¿Existirán variaciones en el gen de la Apo E entre los individuos pertenecientes a las distintas denominaciones étnicas encontradas en nuestro país? ¿Cuál es el alelo del gen de la Apo E más frecuente en las poblaciones Venezolanas, principalmente en la población mestiza que constituye aproximadamente el 85% de la población? ¿Como se comportan estas frecuencias con respecto a las reportadas en otras poblaciones?.

Debido a la importancia que tiene conocer las frecuencias alélicas del gen de la Apo E en individuos sanos de distintas poblaciones y determinar la variabilidad de estas al compararlo con las frecuencias reportadas alrededor del mundo, el laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del IVIC, se ha planteado esta línea de investigación, siendo el presente estudio el primer aporte a este tema en dicho laboratorio, cuyo propósito a largo plazo es establecer las frecuencias genotípicas en el país tanto en las etnias más importantes como en pacientes que sufren demencias.

Objet Inicialmente esta investigación comprende el análisis de algunas etnias de la población Venezolana; entre ellas dos poblaciones indígenas, Yukpa y Bari; dos poblaciones que se caracterizan por orígenes étnicos particulares como lo son la población de Curiepe, constituida por individuos de origen negroide, y la población de la Colonia Tovar, constituida por individuos de origen Alemán; y un grupo heterogéneo de individuos Mestizos del país; con el fin de determinar las frecuencias alélicas del gen de la Apo E en estos individuos obteniendo datos que permitan identificar el comportamiento de este polimorfismo y compararlo con los datos reportados en otras poblaciones. Se usará el gen de la Apo E a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y Polimorfismo de Longitud de Repetición Escalonada para obtener de esta manera el genotipo para cada individuo.

- Estimar las frecuencias genotípicas y alélicas de Apo E.
- Determinar la proporción general del genotipo de Apo E encontrada entre las cinco poblaciones en estudio.
- Identificar si existe variación en las frecuencias encontradas en los individuos en estudio según el grupo étnico al que pertenecen.
- Comparar las frecuencias alélicas obtenidas con las frecuencias reportadas en otras poblaciones para definir su comportamiento.

Objetivo General

Determinar la frecuencia genotípica y alélica de la Apo E en individuos sanos de las poblaciones Yukpa, Barí, Curiepe, Colonia Tovar y un grupo heterogéneo de Mestizos Venezolanos; para compararlas con las frecuencias reportadas en otras poblaciones.

Objetivos Específicos

- Estudiar el gen de la Apo E a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y Polimorfismo de Longitud de Restricción Enzimática para obtener de esta manera el genotipo para cada individuo.
- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de la Apo E.
- Determinar la proporción general del genotipo de la Apo E obtenido para las cinco poblaciones en estudio.
- Identificar si existe variación en las frecuencias encontradas en los individuos en estudio según el grupo étnico al que pertenecen.
- Comparar las frecuencias alélicas obtenidas con las frecuencias reportadas en otras poblaciones para definir su comportamiento.

MARCO METODOLÓGICO de la Colonia Torontó, ubicada en el estado Aragua, conformada por habitantes de origen alemán (Arias, 1974).

Tipo de Investigación

Para este estudio se seleccionaron 240 muestras de ADN provenientes de individuos de cinco poblaciones presentes en Venezuela; posteriormente a cada una de dichas muestras se les determinó el genotipo del gen Apo E por la Reacción en Cadena de la Polimerasa y Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción Enzimática (PCR-RFLP) para obtener las frecuencias genotípicas y alélicas de dicho gen en cada población, con la finalidad de compararlas con las reportadas por otras poblaciones y definir su comportamiento.

Población y Muestra

Se trabajó con muestras de poblaciones que han sido utilizadas anteriormente en otros estudios de la línea de investigación que se lleva a cabo en el Laboratorio de Fisiopatología del IVIC. Las poblaciones seleccionadas quedaron conformadas de varios grupos de individuos no relacionados, aparentemente sanos, con edades comprendidas entre 9 a 70 años, pertenecientes a:

- Dos Poblaciones Indígenas, 32 del grupo Yukpa y 41 del grupo Barí, ubicados ambos en la Sierra de Perijá en el Estado Zulia, (Arends, 1979; Díaz, 1976).

Dos grupos de 40 individuos cada uno pertenecientes a dos poblaciones también presentes en Venezuela. La población de Curiepe, ubicada al norte del país en el estado Miranda, formada por habitantes de

origen Negroide, (Chacón,1979); y la población de la Colonia Tovar, ubicada en el estado Aragua, conformada por habitantes de origen Alemán. (Arias, 1974).

Un grupo heterogéneo de 87 individuos mestizos pertenecientes a varios estados del país, constituidos por 33 individuos de San Carlos, 17 de Carabobo, 15 de Caracas, 7 de Miranda, 3 de Mérida y Sucre, 2 de Barinas y Nva. Esparta y 1 de Aragua, Zulia, Táchira, Bolívar y Lara respectivamente.

Procedimiento Metodológico

Purificación del ADN

La toma de muestra fue realizada hace algunos años por diversos colaboradores del laboratorio de Fisiopatología del IVIC; la de los Indígenas se obtuvieron entre 1992 y 1994, las de Curiepe y Colonia Tovar se tomaron en el año 1995 y la de los mestizos son las más recientes entre los años 2001 y 2002 en la Ciudad Hospitalaria Enrique Tejera (CHET), Carabobo; y en el Hospital Vargas, Caracas.

De cada individuo se tomó una muestra de 10 ml de sangre periférica utilizando EDTA, luego se centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm, se separó la capa de leucocitos para extraer el ADN por el método Salting out (Miller, 1988), y finalmente el ADN extraído se ajustó a una concentración de 200 μ g/ml.

El ADN purificado de dichas muestras ha permanecido congelado en el Laboratorio de Fisiopatología del Centro de Medicina Experimental del IVIC, distribuido en tubos Eppendoff de 1,5 ml. Para su uso en esta investigación,

los ADN se trasladaron desde los Revcos donde se encontraban congelados hacia las neveras, para ir adaptándolos a la temperatura ambiente (máximo 25°C) evitando de esta forma dañar dichas soluciones. Luego de su descongelación se realizaron electroforesis junto con un ADN Standard de 200µg/ml (fago λ), para confirmar la concentración y el estado de las soluciones de ADN.

Amplificación de ADN por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método "In Vitro" para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN, que emplea iniciadores sintéticos (Primers), complementarios a secuencias que flanquean el fragmento de interés en el ADN. Cada ciclo de reacción comprende desnaturalización del ADN, hibridación del iniciador y extensión del mismo por la ADN polimerasa. Después de la repetición de estos ciclos se acumula el fragmento específico cuyos extremos están definidos por los iniciadores, (Burckhart,1994).

El ADN genómico se amplificó para un segmento dado del gen que codifica la Apo E, en el cual se encuentran los dos sitios polimórficos (residuos aminos 112 y 158) que distinguen cada alelo. Para esto fue necesario usar los cebadores o iniciadores oligonucleotídicos F4 y F6 descritos por Emi (1988) que permiten obtener un amplimero de 244 pb (pares de bases) aproximadamente. La secuencia F4 y F6 es la siguiente:

F4= 5'- ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC - 3'(nucleótidos 3908-3892).

F6= 5'- TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA - 3'(nucleótidos 3681-3699).

Estos Primers fueron reconstituidos en 1 ml de buffer TE 1X para ajustarlos a la concentración deseada y su estado se confirmó al visualizarlos sobre gel de Agarosa Sigma al 0.65%. (Fig. 5).

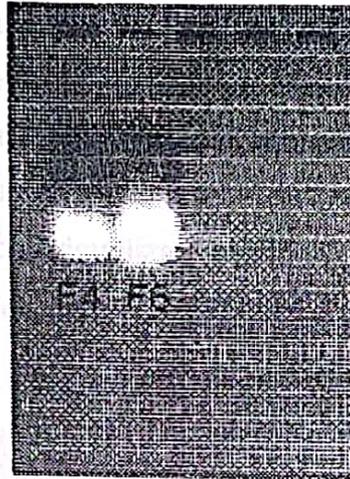


Fig. 5: Ajuste de Primers F4 y F6 sobre gel de Agarosa al 0,65%.

Tanto la amplificación como la restricción (descrita más adelante) se realizaron siguiendo el "Protocolo para el Genotipo Apo E" descrito por Geschwind (1998), con ligeras modificaciones. Para la amplificación se preparó la mezcla de reacción, que contiene:

- PCR Buffer 1X
- Solución Q 1X (Solución Q 5X = $MgCl_2$ 7.5 mM + Dimetil Sulfóxido 5%)
- dNTPs 0,4 mM
- Primer F4 0,6 μ M
- Primer F6 0,6 μ M
- 0,04 U/ μ l de Taq ADN polimerasa (Aquaticus Thermus o Taq).

El volumen total de la mezcla para cada muestra a amplificar fue de 23 μ l, que se dispensaron en 2 μ l de ADN genómico (20 ng/ μ l) servidos previamente en tubos de PCR, para un Volumen de Reacción de 25 μ l. Toda

reacción incluyó un control negativo (sin ADN) para detectar la posible contaminación de los reactivos.

La reacción se realizó en un Termociclador Perkin Elmer. Cada ciclo de la reacción comprendió desnaturalización del ADN a 94°C por 5 min., seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 0,5 min., hibridación de los cebadores a 60°C por 0,5 min. y extensión de los mismos a 70°C por 1 min. Finalmente se realizó un ciclo de amplificación de 70°C por 10 min. Los amplímeros obtenidos fueron visualizados sobre gel de Agarosa Sigma al 1,5% junto con un marcador de peso molecular de 200 pb (Fago ϕ x174). (Fig.6).

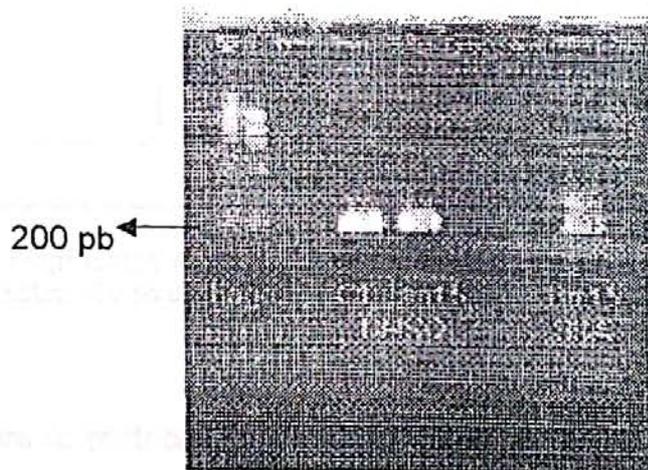


Fig. 6: Electroforesis de los productos amplificados para la región que codifica el gen de la Apo E. El Amplímero obtenido para las muestras C1 y Bm15 fue de aproximadamente 244 pb con un mejor producto utilizando DMSO en la PCR.

Restricción de los Isotipos del Genotipo de la Apo E

Se realizó utilizando la enzima de restricción HhaI, la cual se diluyó a una concentración de 1 U/ml con el buffer de reacción que contiene 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl. Esta enzima reconoce la secuencia GCGC en la posición 112 Arg (e4) y 158 Arg (e3, e4), pero no reconoce la secuencia GTGC en la posición 112 Cys (e2, e3) y 158 Cys (e2),

(Hixson,1990). Después del reconocimiento de la secuencia la enzima corta fragmentos de 91 pb (E3), 83 pb (E2), 72 pb (E4), 48 pb y 35 pb, que corresponden a los genotipos que determinan las isoformas de la Apo E, los cuales se separan por electroforesis en gel. (Fig.7).

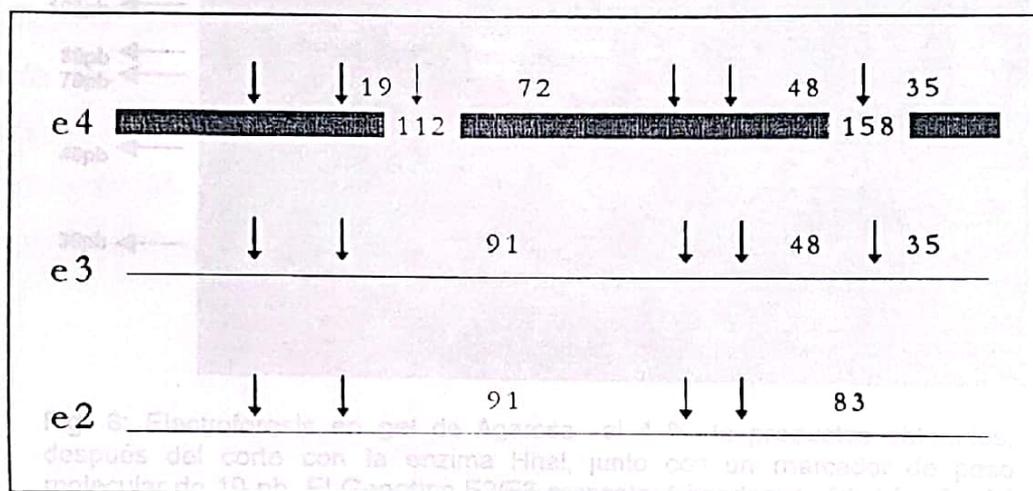


Fig. 7: Fragmentos obtenidos luego que la enzima HhaI reconoce la secuencia GCGC sobre el gen de la Apo E y que determinan los genotipos de esta proteína.

Para la restricción se mezcló 10 ml del producto de PCR con 1 ml de solución de la enzima 1 U/ml y se incubó por 3 horas a 37°C. Luego se agregó esta mezcla en un Gel de Agarosa-1000 Ultra Pure al 4% (11 x 14 centímetros) junto a un marcador de peso molecular de 10 pb (M10) y se corrió a 120V por 1 hora usando una cámara de geles sumergidos (Life-Technologies). El Gel se tiñó en una solución de Bromuro de Etidio (0,2 mg/L), y se visualizaron los fragmentos en forma de bandas de ADN en un transiluminador UV, (Fig. 8). Las electroforesis se realizaron en un buffer TBE 1X y los geles ya solidificados, antes de su uso, se guardaron en nevera 20 minutos para aumentar su resolución.

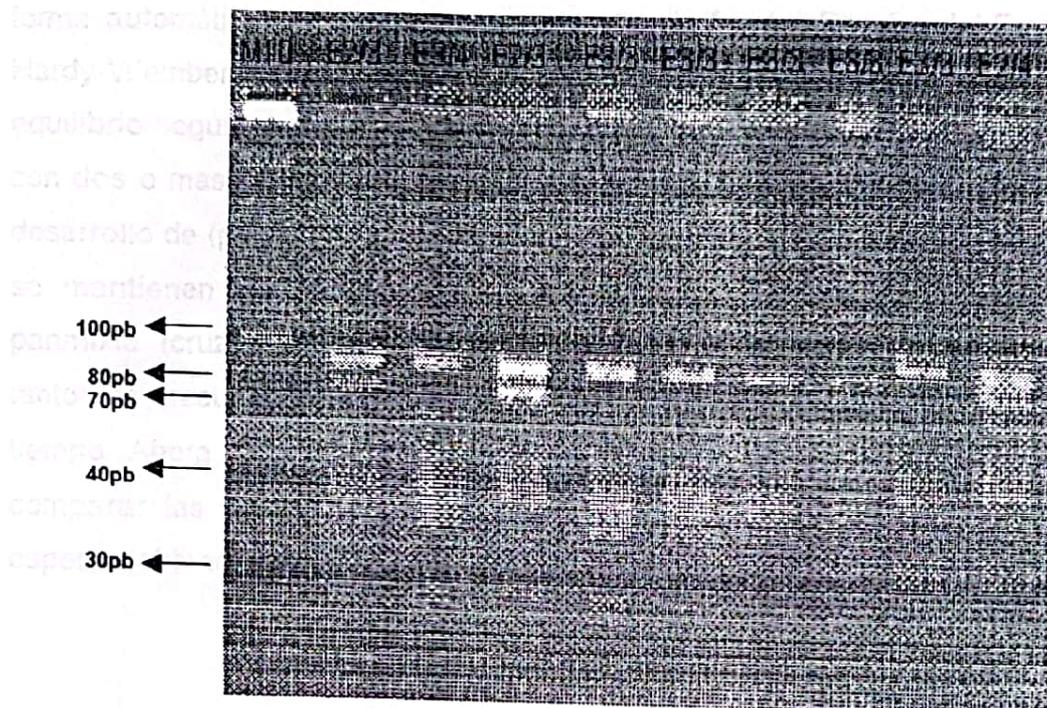


Fig. 8: Electroforesis en gel de Agarosa al 4 % de productos obtenidos, después del corte con la enzima HhaI, junto con un marcador de peso molecular de 10 pb. El Genotipo E2/E3 presenta 4 bandas de 91, 83, 48 y 35 pb; al igual que E3/E4 con bandas de 91, 72, 48, 35 pb, E3/E3 solo muestra 3 bandas de 91, 48 y 35 pb y E2/E4 presenta 5 bandas de 91, 83, 72, 48 y 35 pb respectivamente.

Análisis de los Datos

Luego de someter las muestras a la metodología descrita, se obtuvo de forma directa los genotipos de la Apo E de cada individuo; por consiguiente la frecuencia alélica se determinó para todos los individuos por conteo directo y dividiéndolo entre el número total de alelos presentes. Posteriormente estos datos fueron tabulados por tipo de población según la frecuencia genotípica y frecuencia alélica obtenida para la elaboración de los análisis estadísticos.

Se utilizó un programa estadístico especializado para el estudio genético poblacional llamado ARLEQUIN el cual realiza múltiples cálculos de

forma automática. De interés para este estudio fue la Prueba del Equilibrio Hardy-Weinberg que permite analizar si la población estudiada esta o no en equilibrio según el principio Hardy-Weinberg; el cual explica que en un locus con dos o mas alelos (en este caso son 3), las frecuencias corresponden al desarrollo de $(p+q+r)^2 = p^2 + q^2 + r^2 + 2pq + 2pr + 2qr$ y dicho equilibrio se da si se mantienen las condiciones en un gran de numero de individuos de panmixia (cruzamientos al azar) y ausencia de selección, conservándose tanto las frecuencias alélicas como las genotípicas indefinidamente en el tiempo. Ahora bien, numéricamente este principio se puede definir cuando al comparar las frecuencias genotípicas o alélicas obtenidas con las que se esperan obtener, se obtiene un valor de P mayor a 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Luego de analizar las cinco poblaciones con la metodología descrita, se recogieron los datos en tablas para su mejor comprensión y estudio, las cuales arrojan los siguientes resultados:

Tabla 1: Genotipos de la Apo E de 32 individuos de la Población Indígena Yukpa, asignados tras visualización de las bandas del ADN (PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.

Muestra	PCR 200 pb	Corte Enzimático					Genotipo
		91 pb	83 pb	72 pb	48 pb	35 pb	
3000	+	+			+	+	E3/E3
3003	+	+			+	+	E3/E3
3004	+	+			+	+	E3/E3
3008	+	+		+	+	+	E3/E4
3009	+	+			+	+	E3/E3
3010	+	+		+	+	+	E3/E4
3011	+	+			+	+	E3/E3
3015	+	+			+	+	E3/E3
3016	+	+			+	+	E3/E3
3022	+	+			+	+	E3/E3
3024	+	+			+	+	E3/E3
3025	+	+			+	+	E3/E3
2001	+	+			+	+	E3/E3
2005	+	+			+	+	E3/E3
2006	+	+		+	+	+	E3/E4
2035	+	+		+	+	+	E3/E4
2037	+	+			+	+	E3/E3
2040	+	+			+	+	E3/E3
2054	+	+			+	+	E3/E3
2063	+	+			+	+	E3/E3
2500	+	+			+	+	E3/E3
2503	+	+			+	+	E3/E3
2506	+	+			+	+	E3/E3
2509	+	+			+	+	E3/E3
2517	+	+			+	+	E3/E3
2518	+	+			+	+	E3/E3
2519	+	+		+	+	+	E3/E4
2520	+	+			+	+	E3/E3
2522	+	+			+	+	E3/E3
2524	+	+			+	+	E3/E3
2525	+	+			+	+	E3/E3
2529	+	+			+	+	E3/E3

Positivo (+) = visualización de banda de ADN de "N" pb.

Fuente: Datos obtenidos en el presente Estudio

Tabla 2: Genotipos de la Apo E de 41 individuos de la Población Indígena Barí, asignados tras visualización de las bandas del ADN (PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.

Muestra	PCR 200 pb	Corte Enzimático					Genotipo
		91 pb	83 pb	72 pb	48 pb	35 pb	
0001	+	+				+	E3/E3
0013	+	+				+	E3/E3
0014	+	+				+	E3/E3
0017	+	+			+	+	E3/E4
0018	+	+				+	E3/E3
0021	+	+			+	+	E3/E4
0032	+	+				+	E3/E3
0038	+	+			+	+	E3/E4
0039	+	+				+	E3/E3
0046	+	+			+	+	E3/E4
0058	+	+				+	E3/E3
0059	+	+				+	E3/E3
0073	+	+				+	E3/E3
0074	+	+				+	E3/E3
0077	+	+				+	E3/E3
0116	+	+				+	E3/E3
0127	+	+				+	E3/E3
0128	+	+			+	+	E3/E4
0173	+	+				+	E3/E3
0174	+	+				+	E3/E3
0193	+	+				+	E3/E3
0236	+	+				+	E3/E3
0237	+	+				+	E3/E3
0245	+	+				+	E3/E3
0250	+	+				+	E3/E3
0251	+	+			+	+	E3/E4
0258	+	+				+	E3/E3
0271	+	+				+	E3/E3
0279	+	+			+	+	E3/E4
0298	+	+			+	+	E3/E4
0306	+	+				+	E3/E3
0376	+	+			+	+	E3/E4
0388	+	+				+	E3/E3
0431	+	+				+	E3/E3
0412	+	+				+	E3/E3
0460	+	+				+	E3/E3
0475	+	+			+	+	E3/E4
0476	+	+				+	E3/E3
0544	+	+				+	E3/E3
0572	+	+				+	E3/E3
0575	+	+				+	E3/E3

Positivo (+) = visualización de banda de ADN de "N" pb.
Fuente: Datos obtenidos en el presente Estudio.

Tabla 3: Genotipos de la Apo E de 40 individuos de la Población de Curiepe, asignados tras visualización de las bandas del ADN (PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.

Muestra	PCR 200 pb	Corte Enzimático					35 pb	Genotipo
		91 pb	83 pb	72 pb	48 pb			
2	+	+				+	E3/E3	
4	+	+	+			+	E2/E3	
5	+	+	+	+		+	E2/E4	
6	+	+	+	+		+	E2/E4	
8	+	+	+			+	E2/E3	
10	+	+				+	E3/E3	
11	+	+				+	E3/E3	
12	+	+	+	+		+	E2/E4	
13	+	+	+	+		+	E2/E4	
14	+	+				+	E3/E3	
15	+	+	+			+	E2/E3	
16	+	+				+	E3/E3	
17	+	+	+			+	E2/E3	
18	+	+				+	E3/E3	
20	+	+	+			+	E2/E3	
21	+	+				+	E3/E3	
22	+	+	+	+		+	E2/E4	
23	+	+				+	E3/E3	
25	+	+				+	E3/E3	
31	+	+				+	E3/E3	
32	+	+				+	E3/E3	
33	+	+	+			+	E2/E3	
34	+	+		+		+	E3/E4	
36	+	+	+			+	E2/E3	
37	+	+				+	E3/E3	
38	+	+		+		+	E3/E4	
39	+	+	+			+	E2/E3	
40	+	+				+	E3/E3	
42	+	+				+	E3/E3	
43	+	+				+	E3/E3	
48	+	+				+	E3/E3	
49	+	+				+	E3/E3	
50	+	+				+	E3/E3	
51	+	+				+	E3/E3	
53	+	+				+	E3/E3	
54	+	+				+	E3/E3	
62	+	+				+	E3/E3	
63	+	+				+	E3/E3	
65	+	+				+	E3/E3	
68	+	+				+	E3/E3	

Positivo (+) = visualización de banda de ADN de "N" pb.

Fuente: Datos obtenidos en el presente Estudio.

Tabla 4: Genotipos de la Apo E de 40 individuos de la Población de la Colonia Tovar, asignados tras visualización de las bandas del ADN (PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.

Muestra	PCR 200 pb	Corte Enzimático					Genotipo
		91 pb	83 pb	72 pb	48 pb	35 pb	
9	+	+		+	+	+	E3/E4
13	+	+	+		+	+	E2/E3
15	+	+	+		+	+	E2/E3
21	+	+			+	+	E3/E3
32	+	+			+	+	E3/E3
36	+	+			+	+	E3/E3
38	+	+			+	+	E3/E3
39	+	+		+	+	+	E3/E4
41	+	+			+	+	E3/E3
42	+	+	+		+	+	E2/E3
43	+	+			+	+	E3/E3
44	+	+		+	+	+	E3/E4
55	+	+			+	+	E3/E3
56	+	+			+	+	E3/E3
57	+	+			+	+	E3/E3
60	+	+			+	+	E3/E3
62	+	+		+	+	+	E3/E4
63	+	+		+	+	+	E3/E4
68	+	+			+	+	E3/E3
69	+	+			+	+	E3/E3
70	+	+			+	+	E3/E3
71	+	+			+	+	E3/E3
72	+	+		+	+	+	E4/E4
74	+	+			+	+	E3/E3
75	+	+			+	+	E3/E3
78	+	+			+	+	E3/E3
79	+	+			+	+	E3/E3
80	+	+		+	+	+	E3/E4
82	+	+		+	+	+	E3/E4
83	+	+			+	+	E3/E3
85	+	+			+	+	E3/E3
86	+	+			+	+	E3/E3
87	+	+			+	+	E3/E3
88	+	+			+	+	E3/E3
90	+	+		+	+	+	E3/E4
91	+	+		+	+	+	E3/E4
92	+	+			+	+	E3/E3
93	+	+			+	+	E3/E3
94	+	+			+	+	E3/E3
99	+	+		+	+	+	E3/E4

Positivo (+) = visualización de banda de ADN de "N" pb.

Fuente: Datos obtenidos en el presente Estudio.

Positivo (+) = visualización de banda de ADN de "N" pb.

Fuente: Datos obtenidos en el presente Estudio.

Tabla 5: Genotipos de la Apo E de 87 individuos de la Población Mestiza, asignados tras visualización de las bandas del ADN (PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV.

Muestra	PCR 200 pb	Corte Enzimático					Genotipo
		91 pb	83 pb	72 pb	48 pb	35 pb	
C1	+	+	+		+	+	E2/E3
C3	+	+			+	+	E3/E3
C9	+	+			+	+	E3/E3
C13	+	+			+	+	E3/E3
C16	+	+			+	+	E3/E3
C19	+	+	+		+	+	E2/E3
C20	+	+			+	+	E3/E3
C21	+	+			+	+	E3/E3
C22	+	+			+	+	E3/E3
C23	+	+			+	+	E3/E3
C28	+	+			+	+	E3/E3
C32	+	+			+	+	E3/E3
C34	+	+	+		+	+	E2/E3
C35	+	+			+	+	E3/E3
C39	+	+		+	+	+	E3/E4
C41	+	+	+		+	+	E2/E3
C42	+	+	+		+	+	E2/E3
C43	+	+			+	+	E3/E3
C44	+	+			+	+	E3/E3
C45b	+	+			+	+	E3/E3
C46	+	+	+		+	+	E2/E3
C47	+	+			+	+	E3/E3
C48	+	+			+	+	E3/E3
C49	+			+	+	+	E4/E4
C50	+	+	+	+	+	+	E2/E4
C52	+	+			+	+	E3/E3
C53	+	+	+		+	+	E2/E3
C54	+	+			+	+	E3/E3
C55	+	+	+		+	+	E2/E3
C56	+	+			+	+	E3/E3
C57	+	+	+		+	+	E2/E3
C58	+	+	+		+	+	E2/E3
C59	+	+			+	+	E3/E3
C60	+	+			+	+	E3/E3
C61	+	+			+	+	E3/E3
C62	+	+	+	+	+	+	E2/E4
C63	+	+			+	+	E3/E3
C64	+	+			+	+	E3/E3
C65	+	+	+	+	+	+	E2/E4
C67	+	+			+	+	E3/E3
C68	+	+	+		+	+	E2/E3
C70	+	+	+		+	+	E2/E3
C72	+	+	+		+	+	E2/E3
C73	+	+	+		+	+	E2/E3
C75	+	+	+		+	+	E2/E3

Positivo (+) = visualización de banda de ADN de "N" pb.

Fuente: Datos obtenidos en el presente Estudio.

Tabla 5: Genotipos de la Apo E de 40 individuos de la Población de la Colonia Tovar, asignados tras visualización de las bandas del ADN (PCR-RFLP) sobre gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio a través de luz UV. (Continuación).

Muestra	PCR 200 pb	Corte Enzimático					Genotipo
		91 pb	83 pb	72 pb	48 pb	35 pb	
C76	+	+	+		+	+	E2/E3
C77	+	+	+	+	+	+	E2/E4
C78	+	+	+		+	+	E2/E3
C79	+	+	+		+	+	E2/E3
C80	+	+	+		+	+	E2/E3
P1	+	+			+	+	E3/E3
P2	+	+	+		+	+	E2/E3
P3	+	+	+		+	+	E2/E3
P4	+	+		+	+	+	E3/E4
P5	+	+			+	+	E3/E3
P6	+	+			+	+	E3/E3
P10	+	+	+		+	+	E2/E3
P11	+	+	+		+	+	E2/E3
P12	+	+			+	+	E3/E3
P13	+	+			+	+	E3/E3
P14	+	+			+	+	E3/E3
P15	+	+			+	+	E3/E3
P16	+	+			+	+	E3/E3
P17	+	+			+	+	E3/E3
P18	+	+	+		+	+	E2/E3
P19	+	+	+		+	+	E2/E3
P20	+	+	+		+	+	E2/E3
P21	+	+			+	+	E3/E3
P22	+	+			+	+	E3/E3
P23	+			+	+	+	E4/E4
P24	+	+			+	+	E3/E3
P25	+	+		+	+	+	E3/E4
P26	+	+	+		+	+	E2/E3
P27	+			+	+	+	E3/E4
P28	+	+			+	+	E3/E3
P29	+	+			+	+	E3/E3
P30	+	+		+	+	+	E3/E4
P31	+	+			+	+	E3/E3
P32	+	+	+		+	+	E2/E3
P36	+	+			+	+	E3/E3
P37	+			+	+	+	E4/E4
P38	+	+			+	+	E3/E3
P39	+	+			+	+	E3/E3
P40	+	+			+	+	E3/E3
P41	+	+			+	+	E3/E3
P42	+	+			+	+	E3/E3
P43	+	+	+		+	+	E2/E3

Positivo (+) = visualización de banda de ADN de "N" pb.

Fuente: Datos obtenidos en el presente Estudio.

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

La Tabla 6 presenta las frecuencias genotípicas y alélicas de forma paralela para los 32 indígenas Yuki, se necesitaron los datos del genotipo

Las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5 presentadas anteriormente exponen la distribución de los genotipos obtenidos a través de la visualización directa de las electroforesis en gel de Agarosa al 4% con Bromuro de Etidio sobre un Transiluminador UV para cada población estudiada. Estas electroforesis fueron realizadas inmediatamente después de la digestión con la enzima *HhaI*, ultimo paso del procesamiento para la obtención del genotipo, la cual cortó el amplimero de aproximadamente 200 pb, resultante de la PCR, en varios fragmentos de 35, 48, 72, 83 y 91 pb, reconocidas en forma de bandas en el gel. Dependiendo del genotipo de cada individuo se formaron varias bandas correspondientes al mismo, las cuales se asignaron de la siguiente manera: el genotipo E2/E3 presento 4 bandas de 35, 48, 83 y 91 pb respectivamente; E2/E4 fue es el más fragmentado con 5 bandas de 35, 48, 72, 83 y 91 pb; E3/E3 presento solo tres bandas de 91, 48 y 35 pb; E3/E4 presento estas mismas, 91, 48 y 35 pb más la de 72 pb y E4/E4 presento también tres bandas de 72, 48 y 35pb. Las bandas en común son las de 48 y 35 pb que se presentan en todas las muestras, pero las determinantes para cada alelo son la de 72 pb (alelo e2), 83 pb (alelo e4) y 91 pb (alelo e3).

Tabla 6: Frecuencias genotípicas y alélicas de la Apo E en 32 individuos Indígenas Yukpa.

Genotipo	Nº de Individuos	Frecuencia
E3/E3	27	0,844
E3/E4	5	0,156
Alelo	Nº de Alelos	Frecuencia
e3	59	0,922
e4	5	0,078

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

La Tabla 6 presenta las frecuencias genotípicas y alélicas de forma paralela para los 32 indígenas Yukpa, se necesitaron los datos del genotipo

para estimar las frecuencias alélicas. Esta población presentó solo dos genotipos, el E3/E3, que es el más común en las poblaciones alrededor del mundo sobre todo en las poblaciones indígenas, este genotipo estuvo presente en 27 individuos de los 32 estudiados es decir una frecuencia de 0,844 (resultado de la división 32/27); y el E3/E4, que es una variante del genotipo en el cual se expresa el alelo e4, solo estuvo presente en 5 individuos con una frecuencia de 0,156. Las frecuencias alélicas presentadas en el segundo plano se obtuvieron al dividir el número total de cada alelo presente en los genotipos entre el número total de alelos. Lógicamente solo existen dos alelos, con frecuencias de 0,922 para e3 y 0,078 para e4.

Tabla 7: Frecuencias genotípicas y alélicas de la Apo E en 41 individuos Indígenas Barí.

Genotipo	Nº de Individuos	Frecuencia
<i>E3/E3</i>	31	0,756
<i>E3/E4</i>	10	0,244
<i>Alelo</i>	<i>Nº de Alelos</i>	<i>Frecuencia</i>
<i>e3</i>	72	0,878
<i>e4</i>	10	0,122

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

La Tabla 7 presenta las frecuencias genotípicas y alélicas para los 41 indígenas Barí. Esta población presentó al igual que los indígenas Yukpa dos genotipos, el E3/E3 que estuvo presente en 31 individuos y el E3/E4 en 10 individuos para una frecuencia genotípica de 0,756 y 0,244 respectivamente. El alelo e3 presento una frecuencia de 0,878 y el alelo e4 una frecuencia de 0,122.

Tabla 8: Frecuencias genotípicas y alélicas de la Apo E en 40 individuos de la población de Curiepe.

Genotipo	Nº de Individuos	Frecuencia
E2/E3	8	0,200
E2/E4	5	0,125
E3/E3	25	0,625
E3/E4	2	0,050
Alelo	Nº de Alelos	Frecuencia
e2	13	0,162
e3	60	0,750
e4	7	0,088

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

La Tabla 8 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas para los 40 individuos de la población de Curiepe; esta población presentó además de los genotipos encontrados en los indígenas las isoformas E2/E3 y E2/E4, es decir la variante e2. Las frecuencias genotípicas obtenidas en orden decreciente fueron las siguientes E3/E3 0,625; E2/E3 0,200; E2/E4 0,125 y E3/E4 0,050. El alelo e3 fue el más frecuente (0,750) seguido por el alelo e2 (0,162) y una mínima expresión para el alelo e4 con frecuencia de 0,088.

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

Tabla 9: Frecuencias genotípicas y alélicas de la Apo E en 40 individuos de la población de la Colonia Tovar.

Genotipo	Nº de Individuos	Frecuencia
E2/E3	3	0,075
E3/E3	26	0,650
E3/E4	10	0,250
E4/E4	1	0,025
Alelo	Nº de Alelos	Frecuencia
e2	3	0,038
e3	65	0,812
e4	12	0,150

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

La Tabla 9 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas para los 40 individuos de la Colonia Tovar. Esta población presentó los dos genotipos comunes en los grupos analizados hasta ahora, E3/E3 y E3/E4 con frecuencias de 0,650 y 0,250 respectivamente siendo ambos los más comunes en los individuos, seguidos por el genotipo E2/E3 y la isoforma homocigota del alelo e4, E4/E4 con 0,025. Las frecuencias alélicas obtenidas fueron las siguientes: e2 0,038; e3 0,812 y e4 0,150.

Tabla 10: Frecuencias genotípicas y alélicas de la Apo E en 87 individuos Mestizos de varios estados de Venezuela.

Genotipo	Nº de Individuos	Frecuencia
E2/E3	27	0,310
E2/E4	6	0,069
E3/E3	46	0,529
E3/E4	5	0,057
E4/E4	3	0,035
Alelo	Nº de Alelos	Frecuencia
e2	33	0,189
e3	124	0,713
e4	17	0,098

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

El último grupo estudiado, la población mestiza comprendida por 87 individuos, presentó cinco de las seis isoformas de la Apo E con frecuencias decrecientes de 0,529 para el genotipo E3/E3, 0,310 para E2/E3, 0,069 para E3/E4, 0,057 para E3/E4 y 0,035 para el genotipo E4/E4. Se nota un aumento del alelo e2 con respecto a los grupos anteriores con una frecuencia de 0,189 y de los alelos e3 y e4 con frecuencias de 0,713 y 0,098 respectivamente.

Las cinco poblaciones estudiadas mantuvieron altas frecuencias para el alelo e3 y la forma homocigota E3/E3, típica característica de la población mundial puesto que el alelo e3 es el más común de los tres alelos del gen de

la Apo E, mientras las variantes e2 y e4 muestran menor frecuencia. El genotipo E3/E4 estuvo presente en todos los grupos, con frecuencias bajas, igual ocurrió con el genotipo E2/E3, excepto en la población mestiza donde existe una frecuencia considerable. Aunque en las tres últimas poblaciones hubo presencia del alelo e2, no se encontró ningún individuo con genotipo E2/E2; y el genotipo E4/E4 presentó frecuencias muy bajas. La frecuencia alélica que es la que permite medir variación, susceptibilidad y comparación con otras poblaciones, se presentó de la forma esperada, con ausencia del alelo e2 en los indígenas y alta variabilidad en el resto de las poblaciones.

Tabla 11: Distribución Porcentual General del Genotipo obtenido para las poblaciones Yukpa, Barí, Curiepe, Colonia Tovar y Mestizos de Venezuela.

Genotipo	Nº Individuos	Porcentaje (%)
E2/E3	38	15,8
E2/E4	12	5
E3/E3	154	64,2
E3/E4	32	13,3
E4/E4	4	1,7
Total	240	100

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

La tabla 11 expone la distribución porcentual de los genotipos en las cinco poblaciones estudiadas para establecer así valores de frecuencia genotípica general. Aunque estos datos no pueden extrapolarse a la población Venezolana, se reportan de esta manera solo con el fin de que sirvan de referencia para futuros estudios. Como se ha venido mencionando, cerca de 65 % de la población presentó el genotipo E3/E3, el genotipo E2/E3 y E3/E4 se distribuyen casi uniformemente con 15,5% y 13,3%, el genotipo E2/E4 que esta conformado por la dos variantes alélicas

del gen presentó frecuencias de 5%, y el mínimo porcentaje fue para el homocigoto E4/E4.

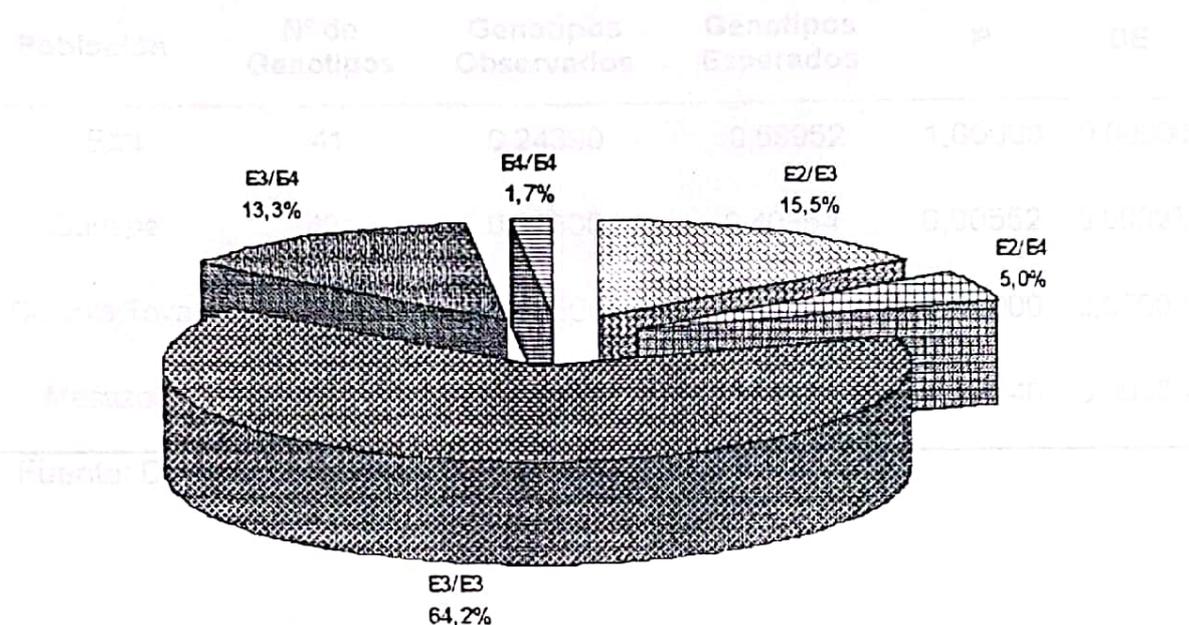


Grafico N°1: Distribución Porcentual General de los Genotipos obtenidos para el conjunto de las cinco poblaciones en estudio Yukpa, Barí, Curiepe, Colonia Tovar y Mestizos de Venezuela.
Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

Ahora, en este caso se observa que tanto la población indígena Barí como Curiepe. Normalmente en toda investigación donde se trabaje con poblaciones mendelianas se debe calcular el equilibrio Hardy-Weinberg con el fin de, dependiendo de su variabilidad, poder determinar las características de esta población. Si en el momento de la conformación del locus el individuo estuvo bajo condiciones de panmixia, ausencia de selección y migración, se puede estimar que sus frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán con la evolución.

Tabla 12: Relación entre la presencia de los genotipos observados y esperados en los individuos en estudio de acuerdo al principio de Hardy-Weinberg en las poblaciones Yukpa, Barí, Curiepe, Colonia Tovar y Mestizos de Venezuela.

Población	Nº de Genotipos	Genotipos Observados	Genotipos Esperados	P	DE
Barí	41	0,24390	0,59952	1,00000	0,00000
Curiepe	40	0,37500	0,40854	0,00552	0,00023
Colonia Tovar	40	0,32500	0,31994	1,00000	0,00000
Mestizos	87	0,43678	0,44921	0,00046	0,00006

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

La Tabla 12 muestra todas las poblaciones estudiadas con el número de genotipos observados en relación con los genotipos esperados según el equilibrio Hardy-Weinberg obtenida por el programa estadístico ARLEQUIN, de esta manera se puede saber si la población en estudio se encuentra en estado de equilibrio según un valor de $P > 0.05$.

Ahora, en este caso se observa que tanto la población indígena Barí como la población de la Colonia Tovar se encuentran en equilibrio presentando un valor de $P = 1,00000$; pero en el caso de los Negros de Curiepe y los individuos Mestizos, existe una variación considerable que se resume en un valor de $P < 0.05$ que determina que esta población aún no ha alcanzado un equilibrio posiblemente debido a su constante mezcla de genes.

Tabla 13: Frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en las poblaciones Yukpa, Bari, Curiepe, Colonia Tovar, Yukpa, Bari, Curiepe, Colonia Tovar y Mestizos.

Alelos Apo E	Yukpa (n=32)		Bari (n=41)		Curiepe (n=40)		Colonia Tovar (n=40)		Mestizos (n=87)	
	n	Frecuencia Alélica	n	Frecuencia Alélica	n	Frecuencia Alélica	n	Frecuencia Alélica	n	Frecuencia Alélica
e2	0	0,000	0	0,000	13	0,162	3	0,038	33	0,189
e3	59	0,922	72	0,878	60	0,750	65	0,812	124	0,713
e4	5	0,078	10	0,122	7	0,088	12	0,150	17	0,098
Genotipo Apo E	n	Frecuencia Genotípica	n	Frecuencia Genotípica	n	Frecuencia Genotípica	n	Frecuencia Genotípica	n	Frecuencia Genotípica
E2/E3	0	0,000	0	0,000	8	0,200	3	0,075	27	0,310
E2/E4	0	0,000	0	0,000	5	0,125	0	0,000	6	0,069
E3/E3	27	0,844	31	0,756	25	0,625	26	0,650	46	0,529
E3/E4	5	0,156	10	0,244	2	0,050	10	0,250	5	0,057
E4/E4	0	0,000	0	0,000	0	0,000	1	0,025	3	0,035

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

La tabla 13 es una recopilación de todas las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en cada población. El objetivo es evaluar el comportamiento de estas frecuencias en cada población y estimar la variación en las mismas, ya que cada grupo estudiado es de origen étnico distinto. Para esto se construyó también un gráfico que permite visualizar de una mejor forma esta variabilidad según la presencia de los alelos.

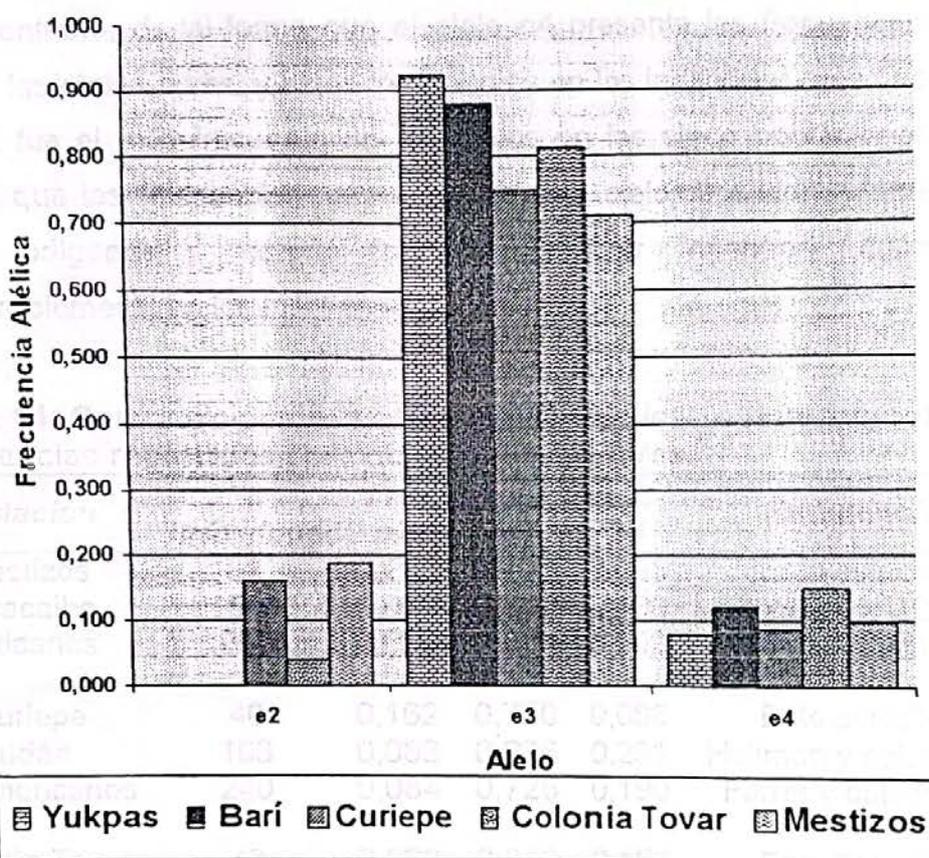


Gráfico N°2: Variación de las Frecuencias alélicas obtenidas en las poblaciones Yukpa, Barí, Curiepe, Colonia Tovar y Mestizos.

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio.

La gran heterogeneidad de los resultados y las diferencias alélicas entre las cinco poblaciones muestra la influencia que pueda representar el origen étnico sobre la expresión de un determinado alelo. Se pudo observar que las etnias más puras o menos mezcladas, como las indígenas y la Colonia Tovar presentan ausencia o baja frecuencia del alelo e2 y en contraste la más mezcladas presentaron los valores de frecuencias más altas de este alelo. Esta variación del alelo e2 pareciera estar compensada con los valores de la frecuencia del alelo e4, puesto que aquí sucede el efecto contrario, de tal forma que el alelo e4 presenta las frecuencias más altas en las etnias puras, y bajas frecuencias en los individuos mezclados. El alelo e3 fue el más frecuente de los alelos en las cinco poblaciones y se observó que las frecuencias más altas de este alelo se encontraron en las etnias indígenas como era de esperar mientras disminuyó considerablemente en los mestizos.

Tabla 14: Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas con las frecuencias reportadas por poblaciones similares.

<i>Población</i>	<i>Nº Individuos</i>	<i>Frecuencia Alélica</i>			<i>Referencia</i>
		<i>e2</i>	<i>e3</i>	<i>e4</i>	
*Mestizos	87	0,189	0,713	0,098	Este estudio
Maracaibo	1665	0,050	0,840	0,100	Molero y col. 2001
Mexicanos	963	0,039	0,859	0,102	Hannis y col. 1991
*Curiepe	40	0,162	0,750	0,088	Este estudio
Sudán	103	0,083	0,626	0,291	Hallman y col. 1991
Afroamericanos	240	0,084	0,726	0,190	Farrer y col. 1997
*Colonia Tovar	40	0,038	0,812	0,150	Este Estudio
Alemanes	1031	0,077	0,773	0,150	Utermann y col.1984
*Yukpa	32	0,000	0,922	0,078	Este estudio.
*Barí	41	0,000	0,878	0,122	Este estudio.
Xavante	31	0,000	0,980	0,020	DeAndrade col.2000
Yanomami	96	0,000	0,844	0,156	Crews y col. 1993
Mazatecas	75	0,000	0,900	0,100	Gamboa y col. 2000
Surui	24	0,000	0,830	0,170	DeAndrade col.2000
Mayas	135	0,000	0,911	0,089	Kamboh y col. 1991

Fuente: Datos Obtenidos en el Presente Estudio, Gerdes y col 1995.

Finalmente, se compararon todos los datos obtenidos en las poblaciones estudiadas con los datos reportados en poblaciones similares. En este sentido, se tabularon los datos más importantes en conjunto para comparar las frecuencias alélicas para cada grupo. Los datos de los Mestizos se compararon con los reportados en Venezuela por Molero y col. (2001), quienes estudiaron Mestizos de Maracaibo y con los datos reportados para Mestizos Mexicanos. Las frecuencias del alelo e4 fueron similares en las tres poblaciones, pero la población Mestiza Venezolana en este estudio presentó frecuencias altas para e2 a expensas del alelo e3 con su consecuente disminución, sin embargo estas diferencias no son significativas.

En el caso de la población de Curiepe, sus datos fueron comparados con los reportados para Negros de Sudan y para Afroamericanos, aquí se observó similitud en la frecuencia del alelo e3 entre Curiepe y Afroamericanos y ligera diferencia con Negros de Sudan, pero extensa variación en las frecuencias de alelos e2 y e4 en las cuales las frecuencias fueron inversa.

Los datos reportados para alemanes, son muy parecidos a los reportados para la Colonia Tovar donde la mayor variación que se dio fue a nivel del alelo e2.

Por último, los grupos indígenas, fueron comparados con las frecuencias reportadas para indígenas del Brasil (Xavante, Yanomami, Surui y Mazatecas) y México (Mayas). Se observó ausencia del alelo e2 como se esperaba y elevadas frecuencias de e3 con diferencias marcadas para el alelo e4.

Tabla 15: Frecuencias alélicas del gen de la Apo E determinadas por PCR-RFLP en las Poblaciones Mundiales.

Poblaciones Estudiadas	e2	e3	e4	Referencias
CAUCASICOS EUROPEOS				
Finlandia (cinco regiones)	0,039	0,767	0,194	Lentimaki et al., 1990
Finlandia (Helsinki)	0,041	0,733	0,227	Ehnholm et al., 1986
Suecia (Linköping)	0,119	0,675	0,206	von Schenck et al., 1990
Norway (several regiones)	0,090	0,795	0,115	Perdersen & Berg, 1990
Norway (Oslo)	0,083	0,760	0,157	Perdersen & Berg, 1989
Iceland (several regions)	0,068	0,768	0,165	Hallman et al., 1991
Denmark (Aarhus)	0,085	0,741	0,174	This study
Escocia (Grampain regions)	0,083	0,770	0,143	Cumming, 1984
Netherlands (tres regiones)	0,082	0,750	0,167	Smit et al., 1988
Alemania (Munster)	0,082	0,782	0,136	Assmann et al., 1984
Alemania (Marburg & Giessen)	0,077	0,773	0,150	Utermann et al., 1984
Alemania (Marburg)	0,141	0,750	0,109	Steinmetz et al., 1989a
Tyrol (not specified)	0,090	0,792	0,118	Hallman et al., 1991
Hungary (not specified)	0,064	0,807	0,129	Hallman et al., 1991
Suecia (Geneva)	0,072	0,821	0,107	James et al., 1987
Francia (Nancy)	0,120	0,764	0,116	Gueguen et al., 1989
Francia (Paris)	0,062	0,797	0,137	Fumeron et al., 1988
Italia (Padova)	0,044	0,857	0,099	Gabelli et al., 1990
España (Barcelona)	0,043	0,855	0,130	Fiol-Castaño et al., 1988
OTROS CAUCASICOS				
Canada (Montreal)	0,065	0,806	0,129	Xhignesse et al., 1991
Canada (Vancouver)	0,086	0,761	0,153	Hill & Prichard, 1990
Canada (Ottawa)	0,078	0,770	0,152	Sing & Davignon, 1985
USA (Framingham)	0,072	0,786	0,140	Ordovas et al., 1987
USA (Pittsburg)	0,059	0,819	0,122	Eichner et al., 1990
USA (Rochester)	0,073	0,784	0,143	Kamboh et al., 1988
USA (Massachussets)	0,130	0,750	0,120	Zannis & Breslow, 1984
New Zeland (Christchurch)	0,120	0,739	0,141	Wardell et al., 1982
CHINOS				
China (Beijing)	0,124	0,806	0,074	Bao-Sheng et al., 1988
Chineses (Singapore)	0,097	0,829	0,070	Hallman et al., 1991
Chineses (Montreal)	0,114	0,822	0,064	Davinon et al., 1988

Fuente: Gerdes, 1995

Tabla 15: Frecuencias alélicas del gen de la Apo E determinadas por PCR-RFLP en las Poblaciones Mundiales. Continuación.

Poblaciones Estudiadas	e2	e3	e4	Referencias
JAPONESES				
Japón(Asahikawa)	0,037	0,846	0,117	Eto et al., 1986
Japón(Kyushu & Fukoka)	0,081	0,849	0,067	Hallman et al., 1991
Japón(Osaka)	0,067	0,829	0,103	Yamamura et al., 1990
Japón(Tokio)	0,038	0,843	0,112	Tsuchiya et al., 1985
Japón(Kuamoto)	0,035	0,72	0,093	Kobori et al., 1988
Japón(Niigata)	0,093	0,787	0,120	Mida, 1990
Japón(Hirichima & Nagasa-i)	0,023	0,891	0,086	Asakawa et al., 1985
Japón(Sendai)	0,061	0,822	0,117	Sano et al., 1988
NEGROS				
Nigeria (Benin)	0,027	0,667	0,297	Sepehnia et al., 1988
USA blacks (3 regiones)	0,034	0,706	0,260	Kamboh et al., 1989
Sudan (Khartoum)	0,083	0,626	0,291	Hallman et al., 1991
OTRAS RAZAS				
Mexicans (Texas, USA)	0,039	0,859	0,102	Hannis et al., 1991
Indias (Singapore)	0,046	0,827	0,127	Hallman et al., 1991
Mayans (Yucatán, México)	0,000	0,911	0,089	Kamboh et al., 1991
Malaysians (Singapore)	0,114	0,767	0,119	Hallman et al., 1991
New Guineans	0,146	0,486	0,368	Kamboh et al., 1990
Dinamarca	0,085	0,741	0,174	Gerdes et al., 1992
Taiwán (Asiáticas)	0,074	0,844	0,082	Evans, 1993
Italia (Centro)	0,066	0,851	0,083	Corbo et al., 1995
Italia (Sur)	0,056	0,858	0,085	Corbo et al., 1995
Italia (Cerdeña)	0,050	0,898	0,052	Corbo et al., 1995
Grecia (Isla Chipre)	0,053	0,877	0,070	Cariolou et al., 1995
Québec	0,137	0,749	0,114	Robitaille et al., 1995
USA (Oregon)	0,100	0,780	0,120	Payami et al., 1995
USA (Pórtland)	0,100	0,780	0,120	Payami et al., 1995
Maruecos	0,041	0,855	0,104	Valvany et al., 1997
España	0,041	0,855	0,104	Valvany et al., 1997
Japoneses	0,042	0,869	0,089	Farrer et al., 1997
Afroamericanos	0,084	0,726	0,190	Farrer et al., 1997
Hispanos	0,067	0,823	0,110	Farrer et al., 1997
Caucásicos	0,083	0,780	0,137	Farrer et al., 1997
USA (Afroamericanos)	0,131	0,668	0,201	Howard et al., 1998
USA (Blancos)	0,076	0,803	0,121	Howard et al., 1998
Portugal	0,044	0,882	0,074	Seixas et al., 1998
Brasil (Wai Wai)	0,020	0,510	0,470	De Andrade et al., 2000
Brasil (Mataco)	0,040	0,880	0,080	De Andrade et al., 2000
Brasil (Caucásicos)	0,075	0,810	0,115	Larrandaburu, 2000
Brasil (Afroamericano)	0,075	0,700	0,225	Larrandaburu, 2000

Fuente: Gerdes, 1995.

CONCLUSIONES

Se investigo el Polimorfismo de la Apo E en cinco poblaciones Venezolanas de distinto origen étnico lográndose los siguientes aportes:

- El genotipo de la Apo E para las poblaciones Yukpa, Barí, Curiepe, Colonia Tovar y Mestizos en conjunto esta conformado por E3/E3 64,2%, E2/E3 15,5%, E3/E4 13,3%, E2/E4 5% y E4/E4 1,7%, con ausencia del Genotipo E2/E2 en todas las poblaciones e Isoformas del alelo e2 en las poblaciones Indígenas.
- El alelo más frecuente en los Individuos Venezolanos es el e3 con frecuencias comprendidas entre 0,922 y 0,713, seguido por el alelo e4 con frecuencia entre 0,150 y 0,078, y el alelo menos frecuente es el e2 que se encuentra ausente en los indígenas y sus frecuencias en Blancos, Negros y Mestizos varía de 0,169 a 0,088.
- Las frecuencias genotípicas y alélicas varían ampliamente según el origen étnico de los individuos, pero la proporción de los alelos y genotipos se mantiene igual en cada población para el caso de e3 y e4.
- Las frecuencias alélicas de las poblaciones Indígenas Venezolanas Barí y Yukpa, muestran el mismo comportamiento de las poblaciones indígenas de otros países como México y Brasil las cuales presentan elevadas frecuencias del alelo e3, bajas frecuencias de e4 y ausencia del alelo e2.
- La Población de la Colonia Tovar presentó frecuencias alélicas similares a las reportadas para individuos alemanes, lo que se explica por el aislamiento de la población.

RECOMENDACIONES

- Las frecuencias alélicas para los Negros de Curiepe se asemejaron más a las frecuencias reportadas para Afroamericanos habitantes en Brasil que a la de la población del Sudan.
- Las frecuencias alélicas en los Mestizos Venezolanos presentaron altos valores para el alelo e2 a expensas del alelo e3, rasgo que es casi frecuente en las poblaciones mestizas de otros países.
- De ser ciertas las suposiciones establecidas hasta ahora que relacionan el alelo e2 con trastornos lipídicos y e4 con Enfermedad de Alzheimer, se puede inferir según estos resultados que la población de la Colonia Tovar presenta mayor riesgo y podría ser susceptible a padecer EA (e4 0,150 y E4/E4 0,025) y la población Mestiza tiene tendencia a sufrir Dislipidemias (e2 0,189 E2/E3 0,310).

RECOMENDACIONES

- En un principio se planteó como objetivo estudiar la distribución del genotipo de la Apo E asociado a los variables sexo y edad. En el transcurso del trabajo, se observó que en lo que se refiere a la edad no se contaba con suficientes individuos para estratificarlos según esta clase, además que las edades entre una y otra población eran totalmente distintas; por ejemplo, las muestras de la Colonia Tovar son todas de jóvenes de 12 a 19 años y los Mestizos comprenden edades entre 7 a 69 años pero solo dos ancianos, y un niño, etc. Al intentar hacer los cuadros no se observó diferencia alguna, por lo que se decidió eliminar dicho objetivo. Se sugiere trabajar con grupos más grandes y con criterios de selección para poder manejar estas variables, para identificar el comportamiento de dicho genotipo de individuos sanos ante estas variables.

- En pro de seguir aportando datos a este interesante tema, cuya importancia clínica es relevante, puesto que involucra finalmente la demostración o no de un indicador biológico para detectar una patología, se propone continuar con esta investigación, sobre todo estudiando el Polimorfismo de la Apo E en pacientes con Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Lipídicos de los distintos estados Venezolanos.

BIBLIOGRAFIA

- Arends, T. (1992). *Estructura Genética de la Población Indígena de Venezuela*. Universidad de los Andes. Caracas.
- Arias, S. (1974). *Inherited congenital profound deafness in a genetic isolate*. *Birth defects*. Orig Artic Series 10, 230-243.
- Asada, T., (cols). (1996). *Apolipoprotein E allele in centenarians*. *Neurology* 46, 1484-1485.
- Balleri, S; Bellincampi, L., (cols). (2002). *Apolipoprotein E genotyping: a comparative study between restriction endonuclease mapping and allelic discrimination with the LightCycler*. *Clinica Chimica Acta* 317, 71-76.
- Blacker, D; Haines, J., (cols). (1997). *Apo E-4 and age at onset of Alzheimer's disease: the NIMH genetics initiative*. *Neurology* 48 (6), 139-147.
- Boyles, J; Pitas, R., (cols). (1985). *Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system*. *Journal Clinical Investigation* 76, 1501-1513.
- Brousseau, T., (cols). (1994). *Confirmation of the e4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's Disease*. *Neurology* 44, 342-344.
- Burckhart, J. (1994). *Amplification of DNA from whole blood*. *PCR Methods Appl* 3 (4), 239.
- Caccuri, R. (1998). *Enfermedad de Alzheimer y Apolipoproteína E*. RAN [revista en línea], 1 (1), 43. Disponible: <http://www.alzheimer.com.ar/biblioteca/art2.htm> [Consulta: 2002, Febrero 06].
- Cariolou, M., (cols) (1995). *Underexpression of the Apolipoprotein E2 and E4 alleles in the Greek Cypriot population of Cyprus*. *Genetic Epidemiology* 12, 489-497.
- Copin, B., (cols). (2002). *Apolipoprotein E-Promoter Single-Nucleotide Polymorphisms Affect the Phenotype of Primary Open-Angle*

- Glaucoma and Demonstrate Interaction with the Myocilin Gene*. Am. J. Hum. Genet. 70, 1575-1581.
- Corbo, R., (cols) (1995). *Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique*. Comparison whit frequency data of other European populations. Ann. Hum. Genet. 59, 197-209.
- Corpechot, Ch., (cols) (2001). *Apolipoprotein E polymorphism, a marker of disease severity in primary biliary cirrhosis?* Journal of Hepatology 35, 324-328.
- Craig, L., (cols). (1991). *Effects of the Apolipoprotein E Polymorphism on Levels of Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins Among Mexican-Americans in Starr Country, Texas*. Arteriosclerosis and Thrombosis 11, 362-370.
- Crews, D., (cols). (1993). *Population Genetics of Apolipoprotein A-4, E, and H Polymorphisms in Yanomami Indians of Northwestern Brazil: Associations with Lipids, Lipoproteins, and Carbohydrate metabolism*. Human Biology 65, 211-224.
- Crook, R; Hardy, J; y Duff, K. *Single-day Apolipoprotein E genotyping*. Journal of Neuroscience Methods 53, 125-127.
- Chacon, A. (1979). *Curiepe*. UCV. Caracas
- Chartier-Harlin, M., (cols). (1991). *Early-Onset Alzheimer's Disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene*. Nature 353,844-845.
- Dawson-Saunders, B y Trapp, R. (1993). *Bioestadística Médica*. El Manual Moderno. México.
- De-Andrade, F., (cols). (2000). *Association of Apolipoprotein E polymorphism with plasma lipids and Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33, 529-537.
- De-Andrade, F., (cols). (2000). *High heterogeneity of Apolipoprotein E gene frequencies in South Americans Indians*. Annals of Human Biology 27 (1), 29-34.
- Díaz, A. (1976). *Estructura Biológica de los Indígenas Yukpa ante el cambio cultural*. UCV. Caracas.

- Duara, R., (cols). (1996). *Alzheimer's disease: Interaction of the apolipoprotein E genotype, family, history of dementia, gender, education, ethnicity, and age of onset.* *Neurology* 46, 1575-1579.
- Eichner, J., (cols). (2002). *Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGE Review.* *American Journal of Epidemiology* 155 (6), 487-495.
- Emi, M., (cols). (1988). *Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoform.* *Genomics* 3, 373-379.
- Evans, A., (cols) (1993). *Polymorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their relationship to plasma lipid variables in healthy Chinese men.* *Human Genetics* 92, 191-197.
- Fallin, D., (cols). (1997). *No Association Between the Very Low Density Lipoprotein Receptor Gene and Late-Onset Alzheimer's Disease Nor Interaction with the Apolipoprotein E Gene in Population-Based and Clinic Samples.* *Genetic Epidemiology* 14, 299-305.
- Falcón, R. y Rivas, T. (1998). *Etiopatogenia de la Enfermedad de Alzheimer.* RAN [revista en línea]. 2 (4), 15-16. Disponible: <http://www.alzheimer.com.ar/biblioteca/art7.htm>. [Consulta: 2002, Enero 15].
- Farrer, L. y Cupples, A. (1997). *Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease.* *JAMA* 278 (16), 1349-1356.
- Gamboa, R., (cols). (2000). *Apolipoprotein E Polymorphism in the Indian and Mestizo Populations of Mexico.* *Human Biology*, 72 (6), 975-981.
- Gamboa, R., (cols). (2001). *Influence of the Apolipoprotein E polymorphism on plasma lipoproteins in a Mexican Population.* *Human Biology* 73, 835-843.
- Gerdes, A., (cols). (1992). *Apolipoprotein E Polymorphism in a Danish Population Compared to Findings in 45 Other Study Populations Around the World.* *Genetic Epidemiology* 9, 155-167.
- Geschwind, D., (cols). (1998). *The Apolipoprotein E e4 Allele Is not a Significant Risk Factor for Frontotemporal Dementia.* *Annals of Neurology* 44 (1), 134-138.

- Gioia, L., (cols). (1998). *PCR-based apolipoprotein E genotype analysis from archival fixed brain*. *Journal of Neuroscience Methods* 80, 209-214.
- Guerrero, C; Yescas, G y Ochoa, M. (1996). *Determinación de la Apolipoproteína E en población mestizo mexicana normal*. *Arch. Neurocién.* 1, 254-255.
- Henderson, J., (cols). (2002). *Apolipoprotein E4 and tau allele frequencies among Choctaw Indians*. *Neuroscience Letters* 324, 77-79.
- Hernández, R.; Fernández, C. y Baptista, P. (1994). *Metodología de la Investigación*. México. Mc Graw Hill.
- Hixson, J y Vernier, D. (1990). *Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI*. *Journal of Lipid Research* 31, 545-548.
- Howard, B., (cols) (1998). *Association of Apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults*. *American Journal of Epidemiology* 148, 859-868.
- Hsieh, J., (cols). (2002). *Characterization of Apolipoprotein E Genetic Variations in Taiwanese: Association with Coronary Heart Disease and Plasma Lipid Levels*. *Human Biology* 74 (1), 25-31.
- Indígenas Venezolanos. (2001). Disponible: <http://www.aldeaeducativa.com>. [Consulta: 2002, Abril 26].
- Kamboh, M., (cols). (1991). *Genetic studies of human apolipoprotein. XVI. APOE Polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico*. *Clinical Genetics* 39, 26-32.
- Kataoka, S., (cols). (1996). *Apolipoprotein E Polymorphism in American Indians and Its Relation to Plasma Lipoproteins and Diabetes*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 918-925.
- Kontula, K., (cols). (1990). *Apolipoprotein E Polymorphism Determined by Restriction Enzyme Analysis of DNA Amplified by Polymerase Chain Reaction: Convenient Alternative to Phenotyping by Isoelectric Focusing*. *Clin. Chem.* 39 (12), 2087-2092.
- Kukull, W., (cols). (1996). *Apolipoprotein E in Alzheimer's disease risk and case detection: a case-control study*. *Journal of Clinical Epidemiology* 49, 1143-1148.

- Kumar, T., (cols). (2002). *Allele Frequencies of Apolipoprotein E Gene Polymorphisms in the Protein Coding Region and Promoter Region (491A/T) in a Healthy Norwegian Population*. Human Biology 74 (1), 137-142.
- Lucotte, G., (cols). (1994). *Association of Apolipoprotein E Allele e4 with Late-Onset Sporadic Alzheimer's Disease*. American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics) 54, 286-288.
- Luthira, K., (cols). (2002). *Apolipoprotein E polymorphism in Northern Indian patients with coronary heart disease: Phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins*. Molecular and Cellular Biochemistry 232, 97-102.
- Maekawa, B., (cols). (1995). *Apolipoprotein E Genotyping Methods for the Clinical Laboratory*. Journal of Clinical Laboratory Analysis 9, 63-69.
- Maestre, G., (cols). (1995). *Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease: Ethnic Variation in Genotypic Risks*. Ann. Neurol. 37, 254-259.
- Mahley, R. (1988). *Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science 240, 622-629.
- Marin, G., (cols). (1997). *Absence of the E2 allele of apolipoprotein in Amerindians*. Brazilian Journal of Genetics 20 (4), 741-743.
- Martínez, A. (2001). *Caracterización molecular de la EA en varias familias de Antioquia*. Programa de Neurociencias. BIOGÉNESIS. Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Colombia.
- Mastana, S., (cols). (1998). *Anthropology of the apolipoprotein E (apo E) gene: low frequency of apo E4 allele in Basques and in tribal (Baiga) populations of India*. Annals of Human Biology 25 (2), 137-143.
- Miller, A, Dykes, D y Polesky, H. (1988). *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Research, 16, 1215.
- Molero, A; Pino-Ramirez, G y Maestre, G. (2001). *Modulation by age and gender of risk for Alzheimer's disease and vascular dementia associated with the Apolipoprotein E-e4 allele in Latin Americans findings from the Maracaibo aging study*. Neuroscience Letters 307, 5-8.

- Moreli, L. y Castaño, E. (1997). *Proteínas Anormales en la Enfermedad de Alzheimer*. Ciencia Hoy [Revista en línea], 7. (41). Disponible: <http://www.cienciahoy.org/hoy41/protei1.htm>. [Consulta:2002, Enero 15].
- Olichney, J; Sabbagh, M., (cols). (1997) *The impact of Apolipoprotein E4 on cause of death in Alzheimer's disease*. Neurology 49, 76-81.
- Ordovas, J., (cols). (1987). *Apolipoprotein isoform phenotyping methodology and population frequency whit identification of apoE1 and apoE5 isoforms*. Journal of Lipid Research 28, 371-380.
- Payami, H., (cols) (1997). *A prospective study of cognitive health in the elderly (Oregon Brain aging study): Effects of family history and Apolipoprotein E genotype*. Am. J. Hum. Genet. 60, 948-956.
- Puertas, M. J. (1999). *Genética, Fundamentos y Perspectivas*. 2^{da} Edición. McGRAW-HILL – INTERAMERICANA. España.
- Reich, E. (1999). *Enfermedad de Alzheimer: Manifestaciones clínicas y evolución*. RAN [revista en línea], 2 (4), 17-23. Disponible: <http://www.alzheimer.com.ar/biblioteca/art8.htm>. [Consulta: 2002, Enero 15].
- Robitaille, N., (cols). (1996). *Apolipoprotein E polymorphism in a French Canadian Population of Northeastern Quebec: allele frequencies and effects on blood lipid and lipoprotein levels*. Human Biology 68, 357-370.
- Saito, E., (cols). (2002). *Type III hyperlipoproteinemia with apolipoprotein E2/2 genotype in Japan*. Clin Genet 61, 416-422.
- Santos, V., (cols). (2000). *High Heterogeneity of Apolipoprotein E gene frequencies in South Americans Indians*. Annals of Human Biology 27, 29-34.
- Scacchi, R., (cols). (1997). *Apolipoprotein B and E Genetic Polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador*. Human Biology 69 (3), 375-382.
- Seixas, S., (cols). (1999). *Haplotype analysis of the Apolipoprotein E and Apolipoprotein C1 Loci in Portugal and Sao Tome e Principe (Gulf of Guinea): Linkage Disequilibrium Evidence that Apo E4 is the ancestral ApoE allele*. Human Biology 71, 1001-1008.

- Snowden, C., (cols). (1991). *Disparity between apolipoprotein E phenotypes and genotypes (as determined by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Clinica Chimica Acta 196, 46-58.
- Stengard, J., (cols). (2002). *Contributions of 18 Additional DNA Sequence Variations in the Gene Encoding Apolipoprotein E to Explaining Variation in Quantitative Measures of Lipid Metabolism*. Am. J. Hum. Genet. 71, 501-517.
- Stevens, M., (cols). (1997). *Apolipoprotein E gene and sporadic frontal lobe dementia*. Neurology 48, 1526-1529.
- Tsai, M; Tangalos, E., (cols). (1994). *Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer's disease*. Journal Human Genetics 54, 643-649.
- Utermann, G; Langenbeck, U., (cols) (1980). *Genetics of the Apolipoprotein E system in man*. Journal Human Genetic 32, 339-347.
- Valveny, N; Esteban, E., (cols). (1997). *APO E polymorphism in Spanish and Moroccan populations*. Clinical Genetic 51, 354-356.
- Wenham, P; Price, W y Blundell, G. (1991). *Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR*. The Lancet 337, 1158-1159.
- Wenham, P; Newton C y Price, W. (1991). *Analysis of Apolipoprotein E Genotypes by the Amplification Refractory Mutation System*. Clin. Chem. 37 (2), 241-244.