

# Polimorfismos de ApoE y daño vascular en diabéticos tipo 2

Dres. Anahí Guerra\*, Víctor Raggio†, Dra. Quím. Patricia Esperón‡, Dres. Laura Fraga§, José Valiño¶, Ariel Pisano Sánchez\*\*\*, Ariel Pisano Rondeau††, Rosario Martínez‡‡, Mag. Lic. Fernando Borgia§§, Dres. Emma Schwedt¶¶, Adriana Belloso\*\*\*, Mario Stoll†††

## Resumen

**Introducción:** la apolipoproteína E (ApoE) es un constituyente de las lipoproteínas plasmáticas con un importante rol en el metabolismo como ligando de receptores de lipoproteínas. Las variaciones en el locus de ApoE se vinculan a variaciones en las concentraciones de lipoproteínas de baja densidad (LDL) plasmáticas. El alelo E4 se ha vinculado a aumento del riesgo cardiovascular, a progresión de la nefropatía diabética así como a severidad y progresión de neuropatía y retinopatía diabéticas. El alelo E2 se asocia a un efecto final protector para el desarrollo de enfermedad cardiovascular.

**Objetivos:** estudiar la asociación entre este polimorfismo y las repercusiones macroangiopáticas, en especial cardiopatía isquémica, y el lipidograma en los pacientes diabéticos.

**Material y método:** se estudiaron 78 pacientes diabéticos tipo 2, menores de 85 años de edad, valorando la asociación entre el polimorfismo de ApoE y las repercusiones macroangiopáticas y microangiopáticas de la diabetes, el lipidograma

y la edad al diagnóstico de la diabetes. La determinación genotípica se realizó por métodos estándar de amplificación-restricción previo consentimiento informado. Las variables se analizaron utilizando chi cuadrado y prueba de Fisher. Error alfa menor a 0,05.

**Resultados:** la frecuencia de portadores del alelo E4 de la Apo E entre los individuos con complicaciones macroangiopáticas (43,5%) fue mayor que entre los que estaban libres de estas complicaciones (26,2%), si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La presencia de cardiopatía isquémica se asoció en forma significativa con el alelo E4, 56% versus 25%. La presencia del alelo E4 se asoció significativamente con un diagnóstico de diabetes antes de los 40 años. Los pacientes con alelos de riesgo presentaron valores de LDL y triglicéridos (TG) aumentados.

**Conclusiones:** el alelo E4 se asoció a un mayor riesgo de cardiopatía isquémica y una edad al diagnóstico de DM2 menor a 40 años. Se evidenció un efecto marcado del genotipo de ApoE sobre el perfil lipídico de los pacientes diabéticos tipo 2.

\* Especialista en Medicina Interna. Ex Postgrado de Clínica Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

† Profesor Agregado (orientación clínica), Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

‡ Profesor Agregado Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad de la República. Directora Técnica del Laboratorio de Genética Molecular de la Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular. Uruguay.

§ Ex Asistente de Clínica Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

¶ Profesor Agregado de Clínica Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

\*\* Especialista en Medicina Interna. Ex Postgrado de Clínica Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Cooperativa Médica de Florida. Uruguay.

†† Médico de Cooperativa Médica de Florida. Uruguay.

‡‡ Profesora Agregada de Clínica Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

§§ Magister en Sociología. Licenciado en Ciencias Sociales. Universidad de la República. Uruguay.

¶¶ Profesora Agregada de Cátedra de Nefrología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

\*\*\* Ex Profesora Directora de Clínica Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Uruguay.

††† Coordinador Área de Genética Cardiovascular, Laboratorio de Genética Molecular, Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular. Uruguay.

Correspondencia: Dra. Anahí Guerra. Mario Cassinoni 1440, Montevideo. Uruguay.

Correo electrónico: anahiguerra@gmail.com

Conflicto de intereses: los autores del presente artículo declaran que no existen conflictos de intereses.

Recibido: 9/12/12

Aceptado: 6/5/13

**Palabras clave:** APOLIPOPROTEÍNA E4  
DIABETES MELLITUS TIPO 2 – complicaciones  
ISQUEMIA MIOCÁRDICA

**Key words:** APOLIPOPROTEIN E4  
DIABETES MELLITUS TYPE 2 – complications  
MYOCARDIAL ISCHEMIA

## Introducción

La diabetes mellitus (DM) es la afección endócrino-metabólica con mayor prevalencia a nivel mundial, correspondiendo más de 90% de los casos a diabetes tipo 2 (DM2). Estos pacientes presentan una morbimortalidad global y de causa cardiovascular (CV) dos a cuatro veces mayor que la población general<sup>(1)</sup>.

Se ha intentado identificar factores de riesgo CV no tradicionales que expliquen la variabilidad interindividual en sujetos que expuestos a los factores de riesgo clásicos presentan, sin embargo, un perfil evolutivo diferente en relación al daño en órganos blanco. Estudios epidemiológicos y familiares han demostrado la influencia de factores hereditarios en la aparición y progresión de estas complicaciones<sup>(2-5)</sup>. En la última década la búsqueda de los determinantes genéticos del daño vascular en diabéticos ha sido un área de intensa investigación. Así se ha determinado la influencia de polimorfismos en varios genes en la aparición y progresión del daño en órganos blanco en patologías crónicas como la DM<sup>(6)</sup>.

La ApoE es un constituyente de las lipoproteínas plasmáticas con un importante rol en el metabolismo como ligando de receptores de lipoproteínas. El gene de la ApoE se localiza en el cromosoma 19q13.2. Las tres isoformas proteicas más frecuentes, ApoE2, ApoE3 y ApoE4, son productos alélicos del mismo locus y ocurren en frecuencias que varían entre poblaciones, pero que se aproximan a 8%, 79% y 13%, respectivamente. Estos alelos se heredan en forma mendeliana simple y su combinación genera seis genotipos posibles: tres homocigotos (E2/E2, E3/E3, E4/E4) y tres heterocigotos (E2/E3, E2/E4, E3/E4)<sup>(7,8)</sup>.

Las variaciones en el locus de ApoE son el factor genético más relevante a nivel poblacional que afecta las concentraciones de colesterol-LDL plasmático. El alelo E4 se asocia a un aumento de la LDL así como con partículas LDL de mayor densidad y propensas a la oxidación<sup>(9)</sup>. Los pacientes portadores de este alelo son los que más se benefician del tratamiento con estatinas y de una dieta baja en grasas<sup>(10,11)</sup>, aunque responden menos a la disminución de los niveles LDL<sup>(12)</sup>.

El alelo E4 se vincula con un aumento del riesgo cardiovascular independientemente de sus efectos sobre el

perfil lipídico<sup>(13)</sup>, y potencia de forma sinérgica otros factores como el tabaquismo<sup>(14)</sup>. En individuos diabéticos se ha demostrado un efecto del alelo E4 sobre el daño macrovascular<sup>(15)</sup>, retinopatía<sup>(16)</sup> y posiblemente nefropatía<sup>(17-19)</sup>.

El alelo E2 es el menos frecuente en todas las poblaciones; se asocia al desarrollo de hiperlipoproteinemia familiar tipo III y aterosclerosis prematura en homocigosis<sup>(20)</sup>, pero en heterocigosis se asocia en general a una concentración menor de LDL y mayor de lipoproteínas de alta densidad (HDL), por lo que tiene un efecto protector neto para el desarrollo de enfermedad cardiovascular. El alelo E3 es el más frecuente en la población y no se correlaciona con un aumento del riesgo CV ni dislipemias<sup>(21)</sup>.

En este trabajo se analiza la influencia del genotipo de ApoE sobre indicadores de daño vascular en una población de pacientes con DM2.

## Pacientes y método

### Población

Se analizaron 78 pacientes DM2 en seguimiento en policlínicas de diabetes del Hospital de Clínicas.

Se realizaron entrevistas a los pacientes al concurrir al control en su centro de asistencia, se les solicitaron estudios paraclínicos de valoración de las repercusiones macro y microangiopáticas requeridos para la evaluación anual del paciente diabético. Estos datos se recogieron en una ficha individual. Las variables consideradas fueron:

- **Cardiopatía isquémica:** antecedentes de infarto agudo de miocardio, *angor pectoris* con estudios de detección de isquemia miocárdica positivos debidamente documentados (ergometría, ecocardiografía o centellograma sensibilizados con estrés físico o farmacológico), procedimientos de revascularización miocárdica realizados.
- **Nefropatía incipiente:** microalbuminuria positiva 20-200 µg/min. Se requerirá para considerarse positiva por lo menos dos estudios que la confirmen. De haber presentado el paciente: infección urinaria, proceso febril, descontrol metabólico, gestación, hematuria o insuficiencia cardíaca descompensada, el estudio se realizó resuelto el cuadro intercurrente.
- **Nefropatía establecida:** proteinuria de 24 horas mayor a 500 mg.
- **Insuficiencia renal:** clearance de creatinina menor de 60 ml/min mantenido (en dos oportunidades), de no disponerse en todos los pacientes estudiados se estimó el filtrado glomerular por fórmula de Levey para aquellos pacientes con creatininemias mayores

de 1,1 mg/dl. Se registró azoemia, creatininemia, estudio del sedimento urinario y uricemia.

- **Retinopatía:** presencia en el fondo de ojo de retinopatía proliferativa o no proliferativa.
- **Factores de riesgo vascular asociados:** tabaquismo; hipertensión arterial (según pautas diagnósticas del Séptimo Consenso Americano de Hipertensión Arterial, registrando un promedio de los últimos tres controles en el consultorio, realizados en condiciones estándar, sin que mediara entre los mismos un cambio en la terapéutica farmacológica); dislipemia, e índice de masa corporal (según fórmula peso/talla<sup>2</sup>). Para el control de la hipertensión arterial se tuvieron en cuenta las recomendaciones del Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VII) y de las guías de la American Diabetes Association (ADA) para el paciente diabético, de que las cifras tensionales deben mantenerse en valores de PAS  $\leq$  130 mmHg y PAD  $\leq$  80 mmHg.
- **Antecedentes familiares:** se elaboró una genealogía médica a partir de la memoria familiar del paciente índice, interrogando sobre DM y enfermedad coronaria en los familiares de primer grado (padres, hermandad, hijos) del paciente índice.

#### *Análisis moleculares*

A partir de una muestra de sangre periférica (3 ml) se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) del paciente mediante el uso de kit comercial de purificación de ADN genómico. La determinación genotípica de los polimorfismos de APOE se realizó por técnica de amplificación por PCR y posterior digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP), descrita por Zivelin y colaboradores<sup>(22)</sup>.

#### *Análisis estadístico*

Se utilizaron tests estadísticos no paramétricos analizando datos nominales. Se seleccionó el test de chi cuadrado para el análisis de las variables cualitativas no pareadas, con corrección de Yates según n menor a 60; en caso de análisis con un n total menor de 20 se realizó según prueba de Fisher. Se aceptó un error alfa  $<0,05$ .

#### *Normas éticas*

Se obtuvo consentimiento informado en todos los casos. Este proyecto fue aprobado por la Comisión Honoraria para la Salud Cardiovascular, Uruguay, en el contexto de sus programas de valoración de marcadores moleculares para prevención de la enfermedad cardiovascular.

## **Resultados**

### *Características de la población estudiada*

Las características de la población se detallan en la tabla 1. Se estudiaron 44 hombres (56%) y 34 mujeres (44%) diabéticos, menores de 85 años de edad, de los cuales 79% eran hipertensos, 84% dislipémicos y 19% tabaquistas.

Los antecedentes familiares de DM2 (en familiares de primer grado) estuvieron presentes en 58% de los casos y 43% tenían antecedentes familiares de patología cardiovascular.

La edad de aparición (estimada por la edad al momento del diagnóstico) de la DM2 se estableció en el promedio de los 49 años de edad, con un diagnóstico levemente más temprano en los varones.

El perfil lipídico mostró un leve aumento del colesterol total (CT) y el colesterol asociado a ApoB en las mujeres, pero con superiores valores de HDL-colesterol (10 mg/dL en promedio). La trigliceridemia fue en promedio 45 mg/dL mayor en los hombres.

La frecuencia de portadores del alelo e4 de ApoE fue de 28%, ligeramente mayor a la esperada de acuerdo a las frecuencias determinadas en otras poblaciones. La distribución de genotipos de APOE (figura 1) en los pacientes estudiados está en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ), como se espera al analizar las frecuencias genotípicas para loci de susceptibilidad para patologías complejas de expresión clínica fundamentalmente en el adulto<sup>(23)</sup>. El análisis se realizó con 66 pacientes de los que se contaba con el genotipo.

Las repercusiones estudiadas en la población se detallan en la tabla 2. Se evidenció nefropatía en 44,9% de los casos (microalbuminuria 63%, macroalbuminuria 17% e insuficiencia renal 20%). La retinopatía estaba presente en 20,5% de los casos y cardiopatía isquémica en 20,5%.

### *Relación entre cardiopatía isquémica y la presencia de alelo E4 de APOE*

La cardiopatía isquémica se asoció en forma significativa con la presencia del alelo E4: la misma apareció en 56% de los portadores de este alelo versus 25% en los no portadores (chi cuadrado/Pearson  $p < 0,05$ ) (figura 2).

### *Relación entre la edad al diagnóstico de diabetes y el genotipo de APOE*

Se observó una edad al diagnóstico de la diabetes menor para los individuos de genotipo E3/E4 (44,7 años) en comparación con los E2/E3 (50,5 años) y los E3/E3 (49,8 años) (figura 3). La presencia de un alelo E4 se asoció significativamente con un diagnóstico de diabetes antes de los 40 años ( $p < 0,005$ ) (figura 4).

**Tabla 1.** Características de la población estudiada

	Hombres	Mujeres
Nro. de casos	44 (56%)	34 (44%)
Edad (años)	58,8 ± 9,8	59,4 ± 10,8
AF+ de DM2	25 (56,8%)	22 (64,7%)
AF+ patología CV	18 (40,9%)	16 (47,0%)
Años diagnóstico DM2	11,0 ± 9,3	9,34 ± 6,1
IMC	29,9 ± 4,2	30,9 ± 5,6
HbA1 (%)	8,1 ± 2,2	7,9 ± 1,2
Glucemia (g/L)	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,4
Tabaquismo	16 (36,4%)	8 (23,5%)
Dislipemia	37 (84,1%)	26 (76,5%)
CT (mg%)	215,4 ± 36,0	227,5 ± 53,9
LDL-C (mg%)	125,9 ± 30,4	132,9 ± 43,1
HDL-C (mg%)	46,5 ± 11,3	56,2 ± 11,4
No HDL-C (mg%)	168,8 ± 36,6	171,3 ± 57,4
TG (mg%)	241,7 ± 163,8	196,9 ± 148,8
HTA	31 (70,4%)	22 (64,7%)
PAS (mmHg)	139,6 ± 20,4	135,6 ± 19,4
PAD (mmHg)	85,1 ± 11,9	80 ± 10,6
Nefropatía	23 (52,3%)	12 (35,3%)
Retinopatía	23 (52,3%)	17 (50,0%)
CI	9 (20,4%)	7 (20,6%)
ApoE e4+	12 (29,54%)	9 (26,47%)

AF+: antecedentes familiares positivos; IMC: índice de masa corporal; HbA1: hemoglobina glicosilada; CT: colesterol total; LDL-C: lipoproteínas de alta densidad-colesterol; HDL-C: lipoproteínas de baja densidad-colesterol; TG: triglicéridos; HTA: hipertensión arterial; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CI: cardiopatía isquémica; APOE4+: portadores del alelo e4 de la ApoE.

### Hallazgo de alteraciones en el lipidograma según polimorfismos de APOE

Los pacientes portadores del alelo E4 presentaron valores de colesterol total (CT), LDL y triglicéridos (TG) aumentados con respecto a los que no portaban dicho alelo (tabla 3).

### Asociaciones no evidenciadas

No se encontraron asociaciones significativas entre los genotipos de ApoE y las otras repercusiones parenquimatosas estudiadas: nefropatía y retinopatía.

### Discusión

Se evidenció el efecto del alelo E4 del gene APOE como factor de susceptibilidad para CI y complicaciones macrovasculares de la diabetes. Múltiples estudios en diabéticos<sup>(24,25)</sup> y no diabéticos demostraron que el alelo E4 se asocia con alteraciones pro aterogénicas del perfil lipídico y un aumento significativo del riesgo cardiovascular, independientemente de sus efectos sobre los niveles de lípidos plasmáticos<sup>(13,26)</sup>. En el estudio 4S, el alelo E4 se asocia con un aumento significativo del riesgo cardiovascular y se muestra que los portadores del alelo E4 son los más beneficiados por tratamiento con estatinas<sup>(27)</sup>. Asimismo se ha demostrado la influencia de las interacciones genotipo ApoE-ambiente

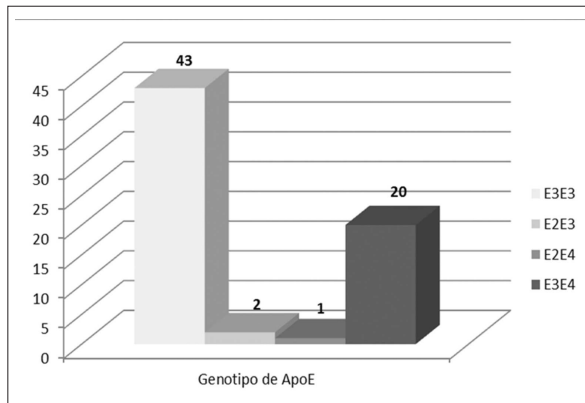


Figura 1. Distribución según genotipo de ApoE (n = 66)

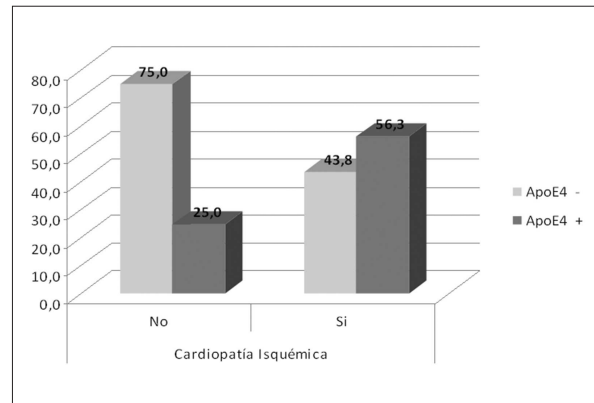


Figura 2. Frecuencia (%) de cardiopatía isquémica según presencia del alelo E4 de ApoE (n = 66)

Tabla 2. Repercusiones vasculares en la población estudiada.

Nefropatía	Frecuencia absoluta/relativa	Grado de nefropatía	Frecuencia absoluta/relativa
Sí	35 (44,87%)	Microalbuminuria	22 (28,20%)
No	40 (51,28%)	Macroalbuminuria	6 (7,69%)
Sd	3 (3,84%)	Insuficiencia Renal	7 (8,97%)
Total	78 (100%)	Total	78 (100%)
Retinopatía diabética	Frecuencia absoluta/relativa	Cardiopatía isquémica	Frecuencia absoluta/relativa
Sí	16 (20,51%)	Sí	16 (20,51%)
No	58 (74,36%)	No	60 (76,92%)
Sd	4 (5,13%)	Sd	2 (2,56%)
Total	78 (100%)	Total	78 (100%)

Sd: sin datos.

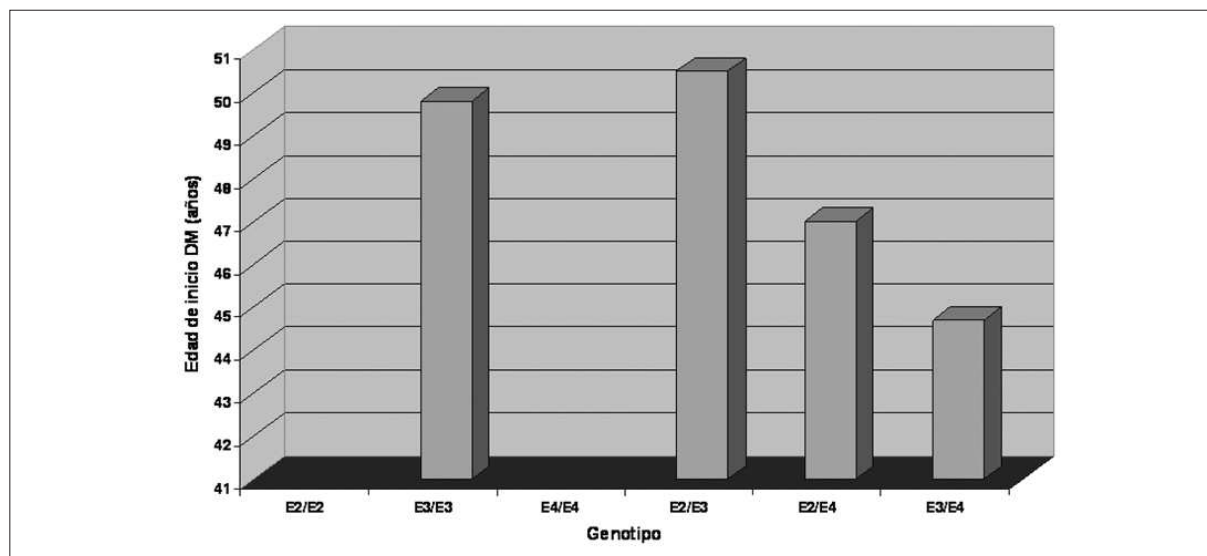
en la determinación de la patología vascular en diabéticos<sup>(28,29)</sup>.

En nuestro trabajo, además, se evidencia la influencia pro aterogénica del alelo E4 sobre el perfil lipídico, con mayores niveles plasmáticos de CT, LDL y TG y menores de HDL en los portadores de este alelo. Estos resultados son compatibles con los encontrados en trabajos internacionales anteriores tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos<sup>(30-32)</sup>. Asimismo se evidencia un nivel mayor de colesterol-no HDL en los portadores del alelo E4, del cual se ha demostrado que es un buen predictor de la incidencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica en diabéticos<sup>(31)</sup>.

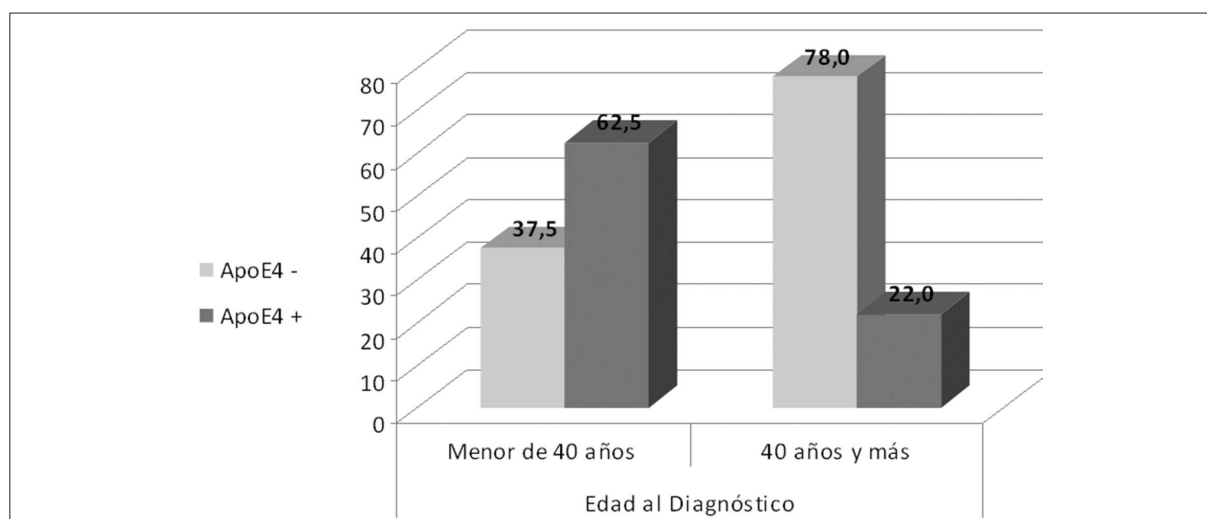
Frecuentemente el diagnóstico de DM2 se realiza por primera vez ante la aparición de complicaciones y una vez establecido el daño en órganos blanco. Si consi-

deramos que la edad al diagnóstico es un indicador de progresión de la DM y un índice de la celeridad en la aparición de alteraciones funcionales y complicaciones, debería existir una relación entre la presencia de genotipos de riesgo como E4 y una menor edad al diagnóstico de esas alteraciones. En la población analizada, cuando el alelo E4 estaba presente, el diagnóstico de la DM2 fue más temprano, lo que podría deberse a la mayor susceptibilidad a complicaciones macrovasculares en estos pacientes.

Tanto la DM2 como la aterosclerosis son patologías multifactoriales y complejas en su etiopatogenia<sup>(32-35)</sup>. Las variantes genéticas participantes en estas afecciones pueden ser decenas y los efectos de cada polimorfismo individual son, en general, pequeños y dependientes del contexto genético y ambiental en el que se expresan.



**Figura 3.** Edad al diagnóstico de diabetes tipo 2 según genotipo de ApoE (n = 66).



**Figura 4.** Frecuencia del alelo E4 de la ApoE en individuos con una edad al diagnóstico de diabetes tipo 2 menor o mayor de 40 años (n = 66)

Adicionalmente, diversas evidencias indican que es la sumatoria de alelos de riesgo en los polimorfismos genéticos estudiados, cuyo efecto puede ser aditivo o sinérgico, la que determinaría una parte de la susceptibilidad de complicaciones vasculares en los DM2<sup>(36,37)</sup>.

Paulatinamente hemos ido incorporando otras variantes polimórficas y asociadas a la enfermedad cardiovascular aterosclerótica en la evaluación de pacientes de alto riesgo cardiovascular. Este trabajo está actualmente en desarrollo y sus resultados se publicarán en el futuro. Entre las variantes analizadas están: polimorfismos simples en la región 9p21<sup>(38)</sup>, el polimorfismo inserción/delección del gene de la enzima convertidora de la angio-

tensina (ACE I/D)<sup>(39)</sup>, el polimorfismo C825T de la proteína G subunidad beta 3 (PGB3)<sup>(40)</sup> y el polimorfismo inserción/delección de la haptoglobina<sup>(41,42)</sup>.

Las principales limitaciones de nuestro estudio derivan de que la muestra estudiada fue pequeña. Para estudios de asociación de polimorfismos genéticos en caracteres complejos, en general se requieren muestras poblacionales grandes para demostrar un efecto<sup>(43)</sup>. Sin embargo, para ciertos fenotipos como enfermedad coronaria se comprobó el efecto de la variante E4 de la ApoE. Para otras repercusiones estudiadas no se encontraron asociaciones con este polimorfismo. Otra limitación es el carácter evolutivo de la mayoría de los fenotipos estu-



**Tabla 3.** Perfil lipídico según presencia del alelo E4 de APOE: el alelo E4 determina un perfil lipídico pro aterogénico. El cálculo se realizó sobre 58 pacientes por no contar con perfil lipídico de todos los pacientes en los que se analizó el genotipo de APOE.

ApoE	n	Colesterol total	LDL-C	HDL-C	No HDL-C	Triglicéridos
E4 (-)	38	215 ± 42,9	122 ± 34,9	54 ± 14,3	160,5 ± 43,9	211 ± 12
E4 (+)	20	227 ± 51,8	135 ± 40,9	45 ± 10,9	182,1 ± 52,8	238 ± 179,6

diados. Para este tipo de afecciones, en general, se utilizan estudios de seguimiento poblacional. De todos modos, aun si se toma como una instantánea de la población de diabéticos estudiada, el efecto del alelo E4 de la ApoE es evidente.

El polimorfismo aquí analizado es uno de los más estudiados en enfermedades humanas multifactoriales. Particularmente relevante es el rol del alelo E4 en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente la enfermedad de Alzheimer (EA)<sup>(44,45)</sup>. Diversos factores de riesgo cardiovascular lo son también para la EA. Esta convergencia probablemente refleje complejas interacciones que hacen que estas patologías se conviertan en factores de riesgo entre ellas y/o compartan factores de riesgo, y, por lo tanto, medidas de prevención comunes<sup>(46-49)</sup>.

La validación de estas asociaciones en nuestra población, genéticamente heterogénea, refuerza los vínculos fisiopatológicos de las variantes polimórficas del gene APOE con complicaciones de la DM2, fundamentalmente cardiovasculares, y las posibilidades en relación al uso de la información genotípica en el manejo clínico de estos pacientes y la prevención en estos grupos familiares.

### Conclusiones

Los resultados obtenidos apoyan el carácter modificador de diferentes genotipos de ApoE en la presentación de la DM2, y el rol pro aterogénico del alelo E4 en estos pacientes. En suma, en nuestro trabajo el alelo E4 se asoció a una mayor probabilidad de una presentación más precoz de sintomatología diagnóstica y una progresión hacia la presencia de cardiopatía isquémica en los pacientes portadores de esta variante. Adicionalmente, en los portadores del alelo E4 se observó una mayor tendencia a asociar complicaciones macroangiopáticas en general (43,5% versus 26,2%) y se evidenció un efecto del genotipo de APOE sobre el perfil lipídico aumentando el índice de riesgo cardiovascular. Estos resultados sugieren la consideración del uso del genotipado de ApoE como un test válido de búsqueda de un marcador constitutivo de progresión temprana de la DM2.

### Abstract

**Introduction:** apolipoprotein E (ApoE) is a constituent of plasma lipoproteins that plays an important role in metabolism acting as lipoprotein receptor ligand. Variations in the ApoE locus are associated to variations in concentration of low plasma density lipoproteins. Allele E4 has been associated to an increase of risk for cardiovascular disease, progress in diabetic nephropathies and severity and progression of diabetic neuropathies and retinopathies. Allele E2 is associated to conferring protection from coronary heart disease (CHD).

**Objectives:** to study the association between this polymorphism and the macroangiopathic effects, especially in terms of ischemic cardiopathy, and lipidogram in diabetic patients.

**Method:** 78 patients less than 85 years old with type 2 diabetes mellitus were studied, being the association between the ApoE polymorphism and the macroangiopathic and microangiopathic effects of diabetes assessed, as well as the lipidogram and age of patients at time of diagnosis. Genotype determination was done with standard extending-restricting methods following informed consent. Variables were analysed using Chi-squared and the Fisher exact test. Alpha error rate was lower than 0.05.

**Results:** frequency of carriers of ApoE allele E4 among individuals with macroangiopathic complications was larger than among those who were free of these complications (26.2%), although differences were not statistically significant. The presence of ischemic heart disease was significantly associated with E4 allele, that is 56% versus 25%. The presence of the E4 allele was significantly associated to the diagnosis of diabetes earlier than 40 years old. Patients with risk alleles evidenced increased values of LDL and triglycerides.

**Conclusions:** allele E4 was associated with a larger risk for ischemic cardiopathy and age of diagnosing type 2 diabetes mellitus lower than 40 years old. The strong effect of genotype ApoE was evidence on the lipid profile of patients with type 2 diabetes.

## Resumo

**Introdução:** a apolipoproteína E (ApoE) é um dos elementos das lipoproteínas plasmáticas e tem um papel importante no metabolismo como ligando dos receptores de lipoproteínas. As variações no locus de ApoE estão vinculadas a variações nas concentrações de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL). O alelo E4 está vinculado a um aumento do risco cardiovascular, à progressão da nefropatia diabética como também à gravidade e a progressão de neuropatia e retinopatia diabéticas. O alelo E2 está associado a um efeito final protetor para o desenvolvimento de doença cardiovascular.

**Objetivos:** estudar a associação entre este polimorfismo e as repercussões macroangiopáticas, especialmente cardiopatia isquêmica, e o lipidograma em pacientes diabéticos.

**Material e método:** foram estudados 78 pacientes diabéticos tipo 2, com menos de 85 anos de idade, para avaliar a associação entre o polimorfismo de ApoE e as repercussões macroangiopáticas e microangiopáticas da diabetes, o lipidograma e a idade no momento do diagnóstico da diabetes. A determinação genotípica foi realizada por métodos padrões de amplificação-restrição, com consentimento informado dos pacientes. As variáveis foram analisadas utilizando chi quadrado e prova de Fisher. Erro alfa menor a 0,05.

**Resultados:** a frequência de portadores do alelo E4 de la Apo E entre os indivíduos com complicações macroangiopáticas (43,5%) foi maior que entre aqueles que não apresentavam essas complicações (26,2%), embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. A presença de cardiopatia isquêmica foi associada significativamente com o alelo E4, 56% versus 25%. A presença do alelo E4 foi associado significativamente com diagnóstico de diabetes antes dos 40 anos. Os pacientes com alelos de risco apresentaram valores de LDL e triglicérides (TG) aumentados.

**Conclusões:** o alelo E4 foi associado a um maior risco de cardiopatia isquêmica e idade no momento do diagnóstico de DM2 menor a 40 anos. Foi observado um efeito do genótipo de ApoE sobre o perfil lipídico dos pacientes diabéticos tipo 2.

## Bibliografía

1. Keane WF, Brenner BM, de Zeeuw D, Grunfeld JP, McGill J, Mitch WE, et al; RENAAL Study Investigators. The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: the RENAAL study. *Kidney Int* 2003; 63(4):1499-507.
2. Berger M, Mönks D, Wanner C, Lindner TH. Diabetic nephropathy: an inherited disease or just a diabetic complication? *Kidney Blood Press Res* 2003; 26(3):143-54.
3. Hansen T. Genetics of Type 2 Diabetes. *Curr Sci* 2002; 83(12):1477-82.
4. Nabel EG. Cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2003; 349(1):60-72.
5. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation* 2004; 110(13):1868-73.
6. Nordfors L, Stenvinkel P, Marchlewska A, Weiss R, Heimbürger O, Bergström J, et al. Molecular genetics in renal medicine: what can we hope to achieve? *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(Suppl 3):5-11.
7. Morbois-Trabut L, Chabrolle C, Garrigue MA, Lasfargues G, Lecomte P. Apolipoprotein E genotype and plasma lipid levels in Caucasian diabetic patients. *Diabetes Metab* 2006; 32(3):270-5.
8. Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sünram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, et al. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Mol Psychiatry* 2006; 11(8):721-36.
9. Contois JH, Anamani DE, Tsongalis GJ. The underlying molecular mechanism of apolipoprotein E polymorphism: relationships to lipid disorders, cardiovascular disease, and Alzheimer's disease. *Clin Lab Med* 1996; 16(1):105-23.
10. Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, Savolainen M, Klausen IC, Hansen PS, et al. The apolipoprotein epsilon4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction : a substudy of the Scandinavian simvastatin survival study. *Circulation* 2000; 101(12):1366-71.
11. Saito M, Eto M, Nitta H, Kanda Y, Shigeto M, Nakayama K, et al. Effect of apolipoprotein E4 allele on plasma LDL cholesterol response to diet therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004; 27(6):1276-80.
12. Donnelly LA, Palmer CN, Whitley AL, Lang CC, Doney AS, Morris AD, et al. Apolipoprotein E genotypes are associated with lipid-lowering responses to statin treatment in diabetes: a Go-DARTS study. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18(4):279-87.
13. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease: a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(10):1250-5.
14. Humphries SE, Talmud PJ, Hawe E, Bolla M, Day IN, Miller GJ. Apolipoprotein E4 and coronary heart disease in middle-aged men who smoke: a prospective study. *Lancet* 2001; 358(9276):115-9.
15. Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Nomani H, Tavilani H, Pourmotabbed T. The presence of apolipoprotein epsilon4 and epsilon2 alleles augments the risk of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 2007; 40(15):1150-6.
16. Santos A, Salguero ML, Gurrola C, Muñoz F, Roig-Melo E, Panduro A. The epsilon4 allele of apolipoprotein E gene is a potential risk factor for the severity of macular edema in



- type 2 diabetic Mexican patients. *Ophthalmic Genet* 2002; 23(1):13-9.
17. **Joss N, Jardine A, Gaffney D, Boulton-Jones JM.** Influence of apolipoprotein E genotype on progression of diabetic nephropathy. *Nephron Exp Nephrol* 2005; 101(4):e127-33.
  18. **Leiva E, Mujica V, Elematore I, Orrego R, Díaz G, Prieto M, et al.** Relationship between Apolipoprotein E polymorphism and nephropathy in type-2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 78(2):196-201.
  19. **Guan J, Zhao HL, Baum L, Sui Y, He L, Wong H, et al.** Apolipoprotein E polymorphism and expression in type 2 diabetic patients with nephropathy: clinicopathological correlation. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(6):1889-95.
  20. **Carmena R, Masana L, Rubiés J.** Alteraciones del Metabolismo de las Lipoproteínas. In: Ferreras Valentí P, Rozman C. *Medicina Interna*. 15 ed. Madrid: Elsevier, 2004; 15:1914-35.
  21. **Rea IM, Mc Dowell I, McMaster D, Smye M, Stout R, Evans A; MONICA group (Belfast).** Monitoring of Cardiovascular trends study group. Apolipoprotein E alleles in nonagenarian subjects in the Belfast Elderly Longitudinal Free-living Ageing Study (BELFAST). *Mech Ageing Dev* 2001; 122(13):1367-72.
  22. **Zivelin A, Rosenberg N, Peretz H, Amit Y, Kornbrot N, Seligsohn U.** Improved method for genotyping apolipoprotein E polymorphisms by a PCR-based assay simultaneously utilizing two distinct restriction enzymes. *Clin Chem* 1997; 43(9):1657-9.
  23. **Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K.** A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002; 4(2):45-61.
  24. **Guang-da X, You-ying L, Zhi-song C, Yu-sheng H, Xiang-jiu Y.** Apolipoprotein e4 allele is predictor of coronary artery disease death in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2004; 175(1):77-81.
  25. **Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Nomani H, Tavilani H, Pourmotabbed T.** The presence of apolipoprotein epsilon4 and epsilon2 alleles augments the risk of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 2007; 40(15):1150-6.
  26. **Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC.** Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002; 155(6):487-95.
  27. **Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, Savolainen M, Klausen IC, Hansen PS, et al.** The apolipoprotein epsilon4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction: a substudy of the Scandinavian simvastatin survival study. *Circulation* 2000; 101(12):1366-71.
  28. **Saito M, Eto M, Nitta H, Kanda Y, Shigeto M, Nakayama K, et al.** Effect of apolipoprotein E4 allele on plasma LDL cholesterol response to diet therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004; 27(6):1276-80.
  29. **Chaudhary R, Likidilid A, Peerapatdit T, Tresukosol D, Srisuma S, Ratanamaneechat S, et al.** Apolipoprotein E gene polymorphism: effects on plasma lipids and risk of type 2 diabetes and coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11:36.
  30. **Eto M, Watanabe K, Iwashima Y, Morikawa A, Chonan N, Oshima E, et al.** Increased frequency of apolipoprotein epsilon 4 allele in type II diabetes with hypercholesterolemia. *Diabetes* 1987; 36(11):1301-6.
  31. **Oh JY, Barrett-Connor E; Rancho Bernardo Study Group.** Apolipoprotein E polymorphism and lipid levels differ by gender and family history of diabetes: the Rancho Bernardo Study. *Clin Genet* 2001; 60(2):132-7.
  32. **Kalina A, Szalai C, Prohászka Z, Reiber I, Császár A.** Association of plasma lipid levels with apolipoprotein E polymorphism in Type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 56(1):63-8.
  33. **Jiang R, Schulze MB, Li T, Rifai N, Stampfer MJ, Rimm EB, et al.** Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B predict cardiovascular disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(8):1991-7.
  34. **Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC.** Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation* 2004; 110(13):1868-73.
  35. **Musunuru K, Kathiresan S.** Genetics of coronary artery disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2010; 11:91-108.
  36. **Dandona S, Stewart AF, Roberts R.** Genomics in coronary artery disease: past, present and future. *Can J Cardiol* 2010; 26(Suppl A):56A-59A.
  37. **Groop L, Lyssenko V.** Genetics of type 2 diabetes: an overview. *Endocrinol Nutr* 2009; 56(Suppl 4):34-7.
  38. **Stoll M, Esperón P, Raggio V, Lorenzo M, Artucio MC, Kuster F.** Combination of genetic polymorphisms and smoker status in high risk families. Poster Presentations. En: *The 16th 2008 World Congress of Cardiology*; 2008 May 18 – 21; Buenos Aires, Argentina.
  39. **O'Donnell CJ, Nabel EG.** Genomics of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2011; 365(22):2098-109.
  40. **Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, et al.** A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007; 316(5830):1491-3.
  41. **Kennon B, Petrie JR, Small M, Connell JM.** Angiotensin-converting enzyme gene and diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16(6):448-58.
  42. **Siffert W.** G protein beta 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(9):1298-306.
  43. **Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick HE, Lee ET, Best L, et al; Strong Heart Study.** Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The Strong Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40(11):1984-90.
  44. **Levy AP, Roguin A, Hochberg I, Herer P, Marsh S, Nakhoul FM, et al.** Haptoglobin phenotype and vascular compli-

- cations in patients with diabetes. *N Engl J Med* 2000; 343(13):969-70.
45. **Risch N, Merikangas K.** The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273(5281):1516-7.
46. **Lane RM, Farlow MR.** Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 2005; 46(5):949-68.
47. **Hsiung GY, Sadovnick AD, Feldman H.** Apolipoprotein E epsilon4 genotype as a risk factor for cognitive decline and dementia: data from the Canadian Study of Health and Aging. *CMAJ* 2004; 171(8):863-7.
48. **Helbecque N, Amouyel P.** Commonalities between genetics of cardiovascular disease and neurodegenerative disorders. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15(2):121-7.
49. **Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sünram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, et al.** Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Mol Psychiatry* 2006; 11(8):721-36.