

M

Mutaciones en la región codificante del dominio de unión de la apolipoproteína B-100: diagnóstico de apolipoproteína B defectuosa familiar

Mutations in the coding region of dominium of union of apolipoprotein B-100: Diagnosis of apolipoprotein B familiar defect

30

Universidad del Zulia. Facultad de Medicina. Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez" *Secciones de Biología Molecular y Médica

Naiilet Arráiz, MgSc, PhD; Maikol Pacheco, BSc; Carem Prieto, MgSc; Carolina Escalona, MgSc; Andrea Mujica, BSc; Endrina Mujica, BSc; Maricarmen Chacín, BSc; Roberto Añez, BSc; Luis Bello, BSc; Willy Roque, BSc; Alexandra Toledo, BSc; Valmore Bermúdez, MD, MPH, PhD

Para Correspondencia: Dra. Naiilet Arráiz. Maracaibo, Estado Zulia. Dirección: habitación: Edif. Bellas Artes, Apto 8 A Telf: 0058-0261-7923996. Oficina: Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. La Universidad del Zulia. Final Av. 20. Sector Indio Mara. Telf: 0058-0261-7597276. Fax: 0058-0261-7597224, E-mail: narraiz@cantv.net

Agradecimiento: al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias, por el financiamiento de estudios de hipercolesterolemia (Proyecto S1-2002000445)

Recibido: 20/02/2011

Aceptado: 29/03/2011

Resumen

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Se han descrito alteraciones en los genes codificantes del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y de su ligando, la apolipoproteína B-100 (APOB-100) asociadas al fenotipo hipercolesterolémico. El objetivo de este estudio fue investigar mutaciones en el exón 26 del gen APOB-100 para contribuir al diagnóstico de Apolipoproteína B defectuosa familiar (FDB). La mutación fue investigada por PCR-SSCP y secuenciación de una región de 345 pb del exón 26 del gen ApoB-100 en 322 pacientes hipercolesterolémicos. Se detectó una mutación heterocigota Arg3480Pro en un paciente, sin embargo esta variante se asoció a una hipercolesterolemia moderada, mientras que una mutación silente fue identificada en el codón 3517 de tres individuos. El fenotipo hipercolesterolémico podría estar modulado por interacción con versiones alélicas del gen ApoE identificadas. El diagnóstico molecular de FDB puede contribuir al desarrollo de terapias individualizadas y nuevos esquemas terapéuticos para disminuir el riesgo cardiovascular en los individuos afectados.

Palabras clave: hipercolesterolemia, ApoB-100, Apolipoproteína B defectuosa familiar, mutación Arg3480Pro

Abstract

Hypercholesterolemia is a risk factor for cardiovascular disease. Alterations in the genes encoding low density lipoprotein receptor (LDLR) and its ligand, apolipoprotein B-100 (ApoB-100) are associated with hypercholesterolemic phenotype. The aim of this study was to investigate mutations in exon 26 of ApoB-100 gene to contribute to the diagnosis of familial defective apolipoprotein B (FDB). The mutation was investigated by PCR-SSCP and sequencing of a region of 345 bp of exon 26 of ApoB-100 gene in 322 hypercholesterolemic patients. A Arg3480Pro heterozygous mutation was detected in a patient, however this variant was associated with moderate hypercholesterolemia, whereas a silent mutation in codon 3517 of three individuals was identified. Hypercholesterolemic phenotype could be modulated by interaction with alleles versions of the APOE gene identified. The molecular diagnosis of FDB can contribute to the development of individualized therapies and new therapies to reduce cardiovascular risk in affected individuals.

Keywords: Hypercholesterolemia, ApoB-100, familial defective apolipoprotein B, Arg3480Pro mutation

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) ocupan el primer lugar entre las causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial^{1,2}. La hipercolesterolemia es una de las dislipidemias más frecuentes asociadas a riesgo cardiovascular^{3,4}. El incremento en la concentración de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL-Col) podría ser el resultado de transporte ineficiente de LDL-Col, debido a alteraciones en el gen codificante del receptor de LDL-Col (LDLR), un desorden genético autosómico dominante, conocido como hipercolesterolemia familiar (FH), caracterizado por niveles elevados de colesterol, presencia de xantomas tendinosos y enfermedad cardíaca coronaria o el ligando, la apoproteína B-100⁵⁻⁷.

Otro defecto genético que altera el transporte de colesterol es la apoproteína B defectuosa familiar (FDB), una enfermedad autosómica codominante, debida a mutaciones en el gen de la apoproteína B-100⁸⁻¹¹. La mayoría de las mutaciones en ApoB-100, se localizan en una región del exón 26 que codifica el dominio de unión de ApoB-100 al receptor de LDL⁹⁻¹². Estas mutaciones afectan el transporte de LDL al interior celular, conduciendo al incremento de la concentración de LDL circulante. El defecto más común en el gen ApoB-100 es un cambio CGC a CAG en el codón 3500 (Arg3500@Gln), mutación que disminuye la afinidad de unión de ApoB-100 a LDLR (8,10,11), aunque también se han descrito mutaciones Arg3500@Trp¹²⁻¹⁴ y Arg3531@Cys^{15,16}.

La incidencia de mutaciones heterocigotas FDB, en descendientes europeos, norteamericanos y la mayoría de las poblaciones estudiadas se ha estimado en 1:500 a 1:700⁹⁻¹². En vista de la asociación entre la mutación en regiones de unión del ligando de ApoB-100 con riesgo cardiovascular, la investigación de estas mutaciones es de gran valor para determinar el riesgo potencial de aterosclerosis prematura.

El objetivo de este trabajo fue investigar mutaciones en la región codificante del dominio de unión del gen de la apolipoproteína B-100 para contribuir al diagnóstico de Apolipoproteína B defectuosa familiar (FDB).

Población y Muestra

Se evaluaron 322 pacientes hipercolesterolémicos (colesterol total mayor de 240 mg/dl) en edades comprendidas entre 25-70 años que asistieron a consulta en el Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez" de la Universidad del Zulia (Estado Zulia, Venezuela). El grupo control consistió en 120 participantes voluntarios de la comunidad con valores de colesterol total ≤ 200 mg/dl. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética del Fondo Nacional de Ciencia, tecnología e Innovación (FONACIT) del Ministerio del poder popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Los participantes firmaron un documento de consentimiento de participación, previa información de la naturaleza del estudio.

Evaluación de laboratorio

Se determinaron valores de colesterol y triglicéridos por métodos enzimáticos utilizando reactivos comerciales Human GmbH (Alemania) y equipo Smart Lab. Cualquier alteración en los niveles lipídicos se confirmó, al menos una vez, con otra determinación en un período de dos semanas siguiendo recomendaciones de la Asociación Americana del Corazón y Colegio Americano de Cardiología (AHA y ACC)³. Para hipercolesterolemia de etiología genética se consideraron valores de colesterol total ≥ 240 mg/dL.

Análisis SSCP

(Single Strand Conformation Polymorphism)

El ADN genómico fue preparado por el método de salting-out¹⁷. Se amplificó por PCR una región de 345 pb del exón 26 del gen ApoB-100, correspondiente a nucleótidos 10551-10895, utilizando oligonucleótidos iniciadores y condiciones de amplificación descritas previamente¹². Se utilizó termociclador MJ Research PTC-100. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Maxim Biotech, INC, USA.

2 μ l (250-350 ng) del producto de PCR se mezcló con igual volumen de buffer formamida (950 ml/L formamida, 10 mM EDTA, 1g/L bromophenol blue, 1 g/L xylene cyanol), se desnaturalizó a 95°C por 10 minutos y se colocó sobre hielo. Las muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida GeneGel SSCP (Amersham Biosciences) y corridos a 200 V en equipo GenePhor electrophoresis Unit (Amersham Biosciences) a 4°C por 2 horas. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y visualizados en lámpara de luz blanca.

Análisis de mutación Arg3531Cys

La mutación Arg3500Cys fue investigada por análisis de restricción del producto de PCR de 345 pb. La sustitución de nucleótidos CGC (Arg) por TGC (Cys) introduce un sitio de restricción para la enzima en el nucleótido 10799¹⁵. Se utilizó la enzima Nsil (Promega) y los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa al 2%.

Secuenciación

Los productos con alteraciones en el patrón de migración fueron purificados con kit de purificación para productos de PCR (Promega), siguiendo instrucciones de la casa manufacturera. La secuenciación se llevó a cabo en secuenciador automatizado ABI Prism 310 (Applied Biosystems), utilizando kit de secuenciación BigDye v3.0 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de las bases de datos, utilizando el algoritmo Blast (disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)¹⁸.

Genotipo del gen ApoE

Se determinaron genotipos de ApoE, debido a que las isoformas de la apoproteína E también podría ejercer algún efecto sobre posibles fenotipos de FDB. El genotipo de ApoE se llevó a cabo por análisis de restricción con la enzima HhaI¹⁹.

En este estudio se investigaron mutaciones en una región del exón 26 involucrada en la unión al receptor de LDL-col del gen codificante para la apoproteína B-100 en 310 pacientes hipercolesterolémicos que asistieron a consulta en el Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas de la Facultad de Medicina de la universidad del Zulia durante el periodo Marzo 2007 hasta septiembre 2009. El grupo incluyó pacientes no relacionados, con valores promedio de colesterol total de $240 \pm 24,3$ mg/dl y triacilglicéridos de $162 \pm 35,6$ mg/dl.

A través de un análisis SSCP de la región que comprende los nucleótidos 10551 a 10895 (codones 3448 a 3561) del exón 26 del gen apoB-100, se seleccionaron fragmentos de ADN que exhibieron patrones de migración alterado para ser sometidos a secuenciación. En uno de los pacientes, (paciente 223) se detectó una transición G a C en el codon 3480 (CGG 3480 CCG), lo cual se traduce en una sustitución del aminoácido arginina por prolina (Arg3480Pro) (Figura 1).

En los fragmentos de los otros tres pacientes (205, 243 y 297) se detectó una transversión T a G en el tercer nucleótido del codón 3517 (CTT 3517 CTG), sin embargo este cambio no afecta la traducción de la proteína, al tratarse de una degeneración del codón para la leucina.

Debido a que las isoformas del gen ApoE también han sido asociadas en la concentración de lípidos séricos, en este estudio se incluyó la genotipificación de ApoE para evaluar posible contribución de otros productos génicos al fenotipo hipercolesterolémico en presencia o ausencia de alteraciones en el gen ApoB-100.

En la tabla 1 se especifican las concentraciones de lípidos séricos, la edad de los pacientes y el genotipo de ApoE. El paciente con la mutación Arg3480Val y uno de los pacientes con la variante silente Leu3517 resultaron heterocigotos para el alelo $\epsilon 4$ (pacientes 223 y 243).

Figura 1



Resultados de alineamiento de secuencia del exón 26 del gen ApoB con la Base de datos, utilizando algoritmo Blast. La secuencia superior (Query) corresponde al exón 26 del gen ApoB del paciente y la secuencia inferior (Sbjct) es la secuencia de referencia de la base de datos utilizada para la comparación. Se muestran solo 180 nucleótidos del fragmento evaluado y se destaca el cambio Arg3480Pro.

Tabla 1. Niveles de lípidos séricos y genotipos de ApoE de individuos con sustituciones de nucleótidos

Paciente N°	Sexo	Edad	Genotipo Apo B	TG (mg/dl)	CT (mg/dl)	LDL-c (mg/dl)	HDL-c (mg/dl)	Genotipo ApoE
205	M	41	Leu3517 Leu	123	245	182	26	$\epsilon 3\epsilon 3$
223	F	74	Arg3480Pro	126	268	167	36	$\epsilon 3\epsilon 4$
243	F	48	Leu3517 Leu	84	293	169	38	$\epsilon 3\epsilon 4$
297	M	59	Leu3517 Leu	134	247	87	35	$\epsilon 3\epsilon 3$

Considerando la posibilidad de que las condiciones del análisis SSCP utilizadas en este trabajo, estandarizadas inicialmente para el análisis de mutaciones en el codon 3500¹², fallaran en detectar ApoB-100 Arg3531@Cys, esta mutación fue investigada por análisis de restricción con la enzima NsiI, debido a que la sustitución de nucleótidos CGC (Arg) por TGC (Cys) introduce un sitio de restricción para la enzima en el nucleótido 10799¹⁵. Esta mutación no fue encontrada en ninguno de los pacientes.

Todas las alteraciones descritas exhibieron carácter heterocigoto. Las mismas alteraciones en la región del exón 26 de ApoB-100 fueron investigadas en 120 pacientes normolipidémicos, los cuales fueron incluidos en el estudio para validar posibles asociaciones entre variaciones de secuencias y alteraciones de lípidos séricos. No se encontraron las alteraciones antes descritas.

El fragmento de 345 pb utilizado en el análisis SSCP incluye los nucleótidos 10551 a 10895 del exón 26 del gen apoB-100 (codones 3448 a 3561), una región involucrada en la unión al receptor de LDL-col donde mapean la mayoría de mutaciones asociadas a FDB.

La mutación ApoB R3500Q es una transición G a A en el nucleótido 10708, descrita en la mayoría de las poblaciones caucásicas^{8-11,16,20,21}. La mutación R3500W resulta de una transición C a T en el nucleótido 10707 y parece ser la alteración predominante asociada a FDB en poblaciones asiáticas^{12-14,22}. Se ha demostrado que estas mutaciones disminuyen la afinidad de unión de LDL-col al receptor de LDL^{8,12,13,15,22}.

La mutación Arg3531Cys descrita posteriormente es menos frecuente y aunque en cultivos de fibroblastos se ha señalado una disminución en la afinidad de unión de ApoB-100 al receptor^{15,16}, otros estudios señalan que esta variante alélica no debería ser considerada como causante de FDB²³.

En este estudio se detectó una mutación CGG@CCG en el codón 3480, que causa un cambio Arg3480Pro, sin embargo esta mutación se asoció a una hipercolestrolémia moderada. La mutación ha sido reportada previamente en individuos Daneses²⁴, pero no ha sido bien caracterizada y no se ha evaluado la afinidad de la partícula de LDL-col con esta versión alélica al receptor de LDL-col. Adicionalmente se debe resaltar que la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen ApoE, el cual se ha asociado a niveles elevados de colesterol sérico en nuestro medio¹⁹, podría estar contribuyendo al fenotipo hipercolesterolémico en este paciente de manera individual o en interacción con la versión mutada de la proteína ApoB-100 identificada.

Se ha señalado que el codón de arginina CGG, incluye el dinucleótido hipermutable que se asocia a mutaciones en varios genes¹⁴, sugiriendo que pudieran existir otras mutaciones en otros residuos de arginina en el gen APOB.

Las transversión T a G en el tercer nucleótido del codón 3517 (Leu 3517) detectada en tres pacientes, ha sido reportada previamente¹³, sin embargo esta alteración en la secuencia constituye una mutación silente que no cambia la secuencia de aminoácidos de la proteína y no se ha demostrado que este polimorfismo modifique la expresión del gen, por lo cual su relevancia clínica en cuanto a su asociación con FDB es incierta. La elevada concentración de colesterol en el paciente 243, podría estar relacionada con la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen ApoE.

Los métodos para detectar solo mutaciones específicas, tales como R3500Q por hibridación alelo específica pueden fallar en detectar otras variantes que pudieran resultar de interés clínico en poblaciones particulares. Es importante extender el estudio a un mayor número de individuos y sus familiares para incrementar la sensibilidad de detección, debido a que las frecuencias reportadas para las mutaciones en diversas poblaciones se encuentran en el rango de 1:500 a 1:700. En este estudio fue detectada una mutación en 312 individuos (1:300), no descartándose la presencia de otras mutaciones en el codón 3500 en la población evaluada. La evaluación de un mayor número de pacientes está en progreso.

Esta investigación representa el primer estudio realizado en la población para la caracterización molecular de defectos genéticos en el gen ApoB en pacientes hipercolesterolémicos. La importancia de la caracterización molecular de alteraciones genéticas asociadas a hipercolesterolemia ha sido resaltada por diversos autores²⁵, debido a que puede contribuir al desarrollo de terapias individualizadas y nuevos esquemas terapéuticos para disminuir el riesgo cardiovascular asociado a niveles elevados de colesterol, lo cual ha sido resaltado por diversos.

Referencias

1. Rosamond WD, Chambeless LE, Folsom AR, Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987-1994. *N Engl J Med* 1998; 339: 861-867.
2. Daviglius ML, Lloyd-Jones DM, Pirzada A. Preventing cardiovascular disease in the 21st century: therapeutic and preventive implications of current evidence. *Am J Cardiovasc Drugs* 2006; 6:87-101
3. Grundy SM, Pasternak R, Greenland MD, Smith S, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100: 1481-1492.
4. Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Adult Treatment Panel III. Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on. National Cholesterol Education Program. National Heart, Lung and Blood Institute. National Institute of Health. NIH Publication Nº 2-5215. Sep. 2002.
5. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver ER, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited diseases*, 6th ed. New York: McGraw-Hill Book CO., 1989:1215-1250.
6. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992; 1:445-466.
7. Leigh SE, Foster AH, Whittall RA, Hubbart CS, Humphries SE. Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Ann Hum Genet* 2008; 72:485-98.
8. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1987; 84:6919-6923.
9. Tybjaerg-Hansen A, Gallagher J, Vincent J, Houlston RS, Talmud P and Dunning AM. Familial defective apolipoprotein B-100: detection in

the United Kingdom and Scandinavia, and clinical characteristics of ten cases. *Atherosclerosis* 1990; 80: 235-242.

10. Shen H, Damcott CM, Rampersaud E, Pollin TI, Horenstein RB, McArdle PF, Peyser PA, Bielak LF, Post WS, Chang YP, Ryan KA, Miller M, Rumberger JA, Sheedy PF, Shelton J, O'Connell JR, Shuldiner AR, Mitchell BD. Familial defective apolipoprotein B-100 and increased low-density lipoprotein cholesterol and coronary artery calcification in the old order amish. *Arch Intern Med.* 2010 Nov 8; 170(20):1850-5.
11. Myant NB, Forbes SA, Day IN and Gallagher J. Estimation of the age of the ancestral arginine 3500 glutamine mutation in human apoB-100. *Genomics* 1997; 45: 78-87.
12. Tai D-Y, Pan J-P, Lee-Chen G-J. Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg3500@Trp mutation in hyperlipidemic Chinese. *Clin Chem* 1998; 44:1659-1665.
13. Fisher E, Scharnagl H, Hoffmann MM, Kusterer K, Wittmann D, Wieland H, Goross W, März W. Mutations in the Apolipoprotein (apo) B-100 receptor-binding region: detection of Apo B-100 Arg3500 Trp associated with two new haplotypes and evidence that apo B-100 Glu3405→Gln diminishes receptor-mediated uptake of LDL. *Clin Chem* 1999; 45: 1026-1038.
14. Taylor A, Bayly G, Patel K, Yarram L, Williams M, Hamilton-Shield J, Humphries SE, Norbury G. A double heterozygote for familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100. *Ann Clin Biochem* 2010; 47:487-490.
15. Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP. Familial ligand-defective Apolipoprotein B: Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest* 1995; 95: 1225-1234.
16. Tamer L, Tanriverdi K, Ercan B, Unlu A, Sucu N, Pekdemir H, Atik U. Apolipoprotein B gene polymorphisms in people in the east Mediterranean area of Turkey. *East Mediterr Health J* 2004; 10:125-130.
17. Miller SA., Dykes DD., Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
18. McGinnis S., & Madden T.L., "BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools." *Nucleic Acids Res* 2004; 32:W20-W25.
19. Arraiz, N, Bermúdez V; Prieto C, Sánchez MP; Escalona C; Sanz E, Rondón N, Reyes F, Velasco M, FRCP Edin. Association between Apolipoprotein E Gene Polymorphism and hypercholesterolemic phenotype In Maracaibo, Zulia State, Venezuela. *Am J Ther.* 2010; 17(3):330-336.
20. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B polymorphism and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:587-91.
21. Viola S, Benlian P, Morali A, Dobbelaere D, Lacaille F, Rieu D, Ginies JL, Maurage C, Meyer M, Lachaux A, Larchet M, Lenearts C, Goulet O, Sarles J, Mouterde O, Girardet JP, The French-Speaking Group for Pediatric Hepatogastroenterology and Nutrition. Apolipoprotein B Arg3500Gln mutation prevalence in children with hypercholesterolemia: a French multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 122-126.
22. Gaffney D, Reid JM, Cameron IM, Vass K, Caslake MJ, Shepherd J, Packard CJ. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidaemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1025-1029.
23. Rabès J-P, Varret M, Devillers M, Aegerter P, Villéger L, Kremp M, Junien C, Boileau C. R3531C mutation in the Apolipoprotein B gene is not sufficient to cause Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:e76-e82.
24. Nissen H, Hansen PS, Færgeman O, Hørder M. Mutation screening of codon 3500 region of the apolipoprotein B gene by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Clin Chem* 1995; 41:419-423.
25. Alves AC, Medeiros AM, Francisco V, Gaspar IM, Rato Q, Bourbon M. Molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia: an important tool for cardiovascular risk stratification. *Rev Port Cardiol.* 2010 Jun;29(6):907-21.

Memorias del Primer Congreso Interamericano
de Diabetes aceptado para su publicación en la revista

**AMERICAN JOURNAL
OF THERAPEUTICS**

