

CONTRIBUCIÓ DEL POLIMORFISME GENÈTIC DE L'APO A-I EN LES MALALTIES CARDIOVASCULARS

M.T. Montañés¹, A. Castells¹, I. Hurtado¹, V. Gracia¹, C. Fiol¹, X. Pintó², M.J. Castañeras³.

¹ Unitat de Recerca Experimental. Hospital Prínceps d'Espanya.

² Servei de Medicina Interna. Hospital Prínceps d'Espanya.

³ Servei de Bioquímica. Hospital Prínceps d'Espanya.

INTRODUCCIÓ

L'arteriosclerosi és un dels principals problemes sanitaris del món occidental. Si bé els factors ambientals són parcialment responsables de l'aparició d'aquesta malaltia, hi ha considerables diferències en els nivells de risc individual. Tant és així, que podem considerar l'arteriosclerosi com el resultat de la interacció entre factors ambientals i un component genètic important (1).

Estudis epidemiològics realitzats en els últims anys han demostrat una associació entre els nivells del colesterol HDL en plasma i el desenvolupament de la malaltia cardiovascular. L'apo A-I és el component proteïc majoritari de les HDL, i s'ha vist que la disminució de les concentracions de c-HDL i apo A-I ha estat associada amb malaltia coronària prematura (2,3,4).

El gen de l'apo A-I ha estat trobat i caracteritzat adjacent als gens de les apo C-III i A-IV. Aquests tres gens formen una família multigènica al llarg del cromosoma 11. Per altra banda, s'ha identificat una diana de restricció polimòrfica per l'enzim Pst-I en l'extrem 3' del gen de l'apo A-I. La presència o absència d'aquesta diana, que s'ha determinat mitjançant la digestió de l'ADN genòmic amb l'enzim Pst-I i la hibridació d'una sonda marcada pel gen de l'apo A-I, es visualitza en bandes de 3.3 kb i 2.2 kb (5).

MATERIAL I MÈTODES

a) Obtenció de mostres de ADN.

Les mostres s'han obtingut de l'hospital Prínceps d'Espanya de Bellvitge. S'han fet dos grups d'estudi: un grup d'individus escollits a l'atzar i un grup d'individus que pateixen algun tipus de malaltia cardiovascular. En els dos grups s'ha separat el "buffy-coat" a partir de sang. S'ha procedit a la lisi cel·lular i nuclear dels leucòcits i tractament amb proteïnasa K (200 ul). Extracció amb fenol/cloroform/isoamilalcohol i quantificació del ADN per espectrofotometria a 260 nm.

b) Digestió de l'ADN amb l'enzim de restricció Pst-I.

L'ADN s'incuba a 37°C un cop s'ha afegit l'enzim Pst-I. La separació dels fragments d'ADN es fa per electroforesi sumergida en gel d'agarosa al 1%.

c) Transferència de l'ADN a una membrana de Nylon.

Prèviament es tracta el gel amb una solució desnaturalitzant per tal de separar les dues cadenes de l'ADN per preparar-lo per a la hibridació. La transferència es fa per capilaritat segons la tècnica de Southern (6). Posteriorment l'ADN es fixa a la membrana amb llum UV.

d) Hibridació i marcatge de la sonda.

Un cop tenim l'ADN fixat a la membrana procedim a la pre-hibridació per tal de bloquejar les unions inespecífiques. La hibridació es fa amb una sonda del gen de l'apo A-I, de 2.2 Kb, obtinguda a partir del plàsmid pUC 8 i clonat en E.Coli, i prèviament marcada amb 32P per Random priming. La hibridació es deixa incubar tota la nit a 65°C. Després d'uns rentats per eliminar l'excés de 32P, s'exposa la membrana a una pel·lícula de raigs X i amb dues pantalles amplificadores i s'incuba a -70°C. Per últim es duu a terme el revelat de la placa fotogràfica.

RESULTATS i DISCUSSIÓ

Després de la digestió amb Pst-I de l'ADN genòmic i la hibridació amb una sonda de 2.2 Kb corresponent al gen de l'apo A-I, s'observa l'aparició de dues bandes en els individus que són heterocigots per l'al·lel de la malaltia, una de 2.2 Kb corresponent a l'al·lel normal i una de 3.3 Kb corresponent a l'al·lel alterat (fig. 1).



Figura 1. Resultat de la hibridació de la sonda marcada del gen de l'apo A-I en una electroforesi en gel d'agarosa al 1% d'ADN genòmic digerit amb Pst-I.

Es detecten 7 individus homocigots per l'al·lel normal (banda de 2.2 kb) i un individu heterocigot pel gen alterat (bandes de 2.2 3.3 kb) en el carril 6.

En l'estudi realitzat fins ara, s'ha pogut detectar 4 individus heterocigots en el grup de 31 pacients de malalties cardiovasculars estudiats, suposant un 12,9%. En la població control, s'ha trobat 3 individus heterocigots d'un total de 91 mostres estudiades. Això suposa un 3,2%. Podem dir doncs que la freqüència al·lèlica resultant en la població control és de 1,6% , mentre que a la població de pacients és de 6,45%.

Paral·lelament s'ha estudiat els nivells de colesterol HDL plasmàtic, i s'ha trobat que de tots els heterocigots detectats en la població de pacients, el 50% tenen nivells baixos de HDL (<0.9 mmol/l) considerats hipoal·falipoproteinèmics. Altrament, en la població control no s'han trobat nivells baixos de HDL en els individus heterocigots.

En els resultats obtinguts es pot veure com a la població de pacients hi ha un percentatge més elevat de l'al·lel alterat que en la població control, la qual cosa ens indica d'una contribució dels factors genètics en l'aparició de malalties cardiovasculars.

Donat que un 50% dels malalts heterocigots són hipoal·falipoproteinèmics, és veu un marcat efecte del polimorfisme genètic associat a aquest tipus de malaltia.

D'altra banda s'ha vist que no tots els individus que presenten el polimorfisme tenen nivells baixos de HDL, del que podem deduir que els nivells de colesterol HDL, a part d'una contribució genètica important estàn influenciats per molts altres factors (tabaquisme, dieta, sexe, diabetes, obesitat...)

BIBLIOGRAFIA

1. J.J. Frohlich, P. Haydn. 1989. The clinical significance of serum high density lipoproteins. *Clin Biochem.* 22: 417-423.
2. G. Assmann and H. Funke. 1990. HDL metabolism and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*, Vol.16 (Suppl.9)
3. J. Johansson, L.A. Carlson, C. Landou, and A.Hamsten. 1991. High density lipoprotein and coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Vol.11, No.1.
4. J.Frohlich, J. Westerlund, D. Sparks, and H. Pritchard. 1990. Familial hypoal·falipoproteinemias. *Clin Invest Med*, Vol.13, No.4.
5. J.M. Ordovas, E.J. Schaefer, D. Salem, R.H. Ward, C.J. Glueck, C. Vergani, P.W.F. Wilson and S.K. Karathanasis. 1985. Apolipoprotein A-I gene polymorphism associated with premature coronary artery disease and familial hypoal·falipoproteinemia. *The New Engl J Med*, Vol.314, No.11
6. E.M. Southern. 1975. Deyection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98: 503-517.