

**“IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS rs429358 Y rs7412 DE LA APOE,
SOBRE LOS COMPONENTES DEL PERFIL LIPÍDICO, LOS NIVELES SÉRICOS
DE APOLIPOPROTEÍNA E Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE
PRE-ECLAMPSIA EN POBLACIÓN COLOMBIANA”**

ELIZABETH GUÍO MAHECHA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD: DE SALUD
ESCUELA: ESCUELA DE MEDICINA - ESCUELA DE LABORATORIO CLÍNICO
BACTERIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2016**

**“IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS rs429358 Y rs7412 DE LA APOE,
SOBRE LOS COMPONENTES DEL PERFIL LIPÍDICO, LOS NIVELES SÉRICOS
DE APOLIPOPROTEÍNA E Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE
PRE-ECLAMPSIA EN POBLACIÓN COLOMBIANA”**

ELIZABETH GUÍO MAHECHA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magister
en Ciencias Básicas Biomédicas**

Director:

GERARDO MANTILLA MORA. Bact, MSc

Co-director:

NORMA SERRANO DÍAZ. MD, MSc.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD: DE SALUD

ESCUELA: ESCUELA DE MEDICINA - ESCUELA DE LABORATORIO CLÍNICO

BACTERIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

BUCARAMANGA

2016

AGRADECIMIENTOS

Para ti que confiaste en mi capacidad, que viste en mí algo diferente, que creíste en mí para vivir en este gran mundo de las ciencias.

Para ti que valoraste mi trabajo y mi potencial, que me diste tu mano para iniciar este camino, para recorrerlo, y me presionaste para encontrar fuerzas y terminarlo. Para ti que en mi tiempo de ausencia y letargia, cuando me consumí en los afanes del día a día, me tuviste paciencia, me esperaste, y me brindaste la oportunidad para retomar este camino.

Para ti que compartiste junto a mí los nuevos logros en estos años, que me diste voz de aliento, me brindaste tu conocimiento y sabiduría, que dedicaste tu valioso tiempo, que me acompañaste en los días, en las noches y en las madrugadas.

Para ti que con una llamada, un abrazo, un mensaje, me diste fuerza, confiaste en mí, me animaste y me apoyaste de forma incondicional, para ti... que me abrazabas diciendo “vamos tú puedes”, que me diste equilibrio.

Para ti: Dios, Padre, Madre, Hijo, Esposo, Hermana, Director(a), Amigo(a), compañero(a), evaluador(a), para ti....

Mil gracias de todo corazón porque sentí en cada acto que hiciste tu cariño, compañía, tu buena energía y me brindaste la confianza para llegar a este grandioso día.

Para ti....

Gracias.

ABREVIATURAS

Apo	Apolipoproteínas
ApoE	Apolipoproteína E
APOE	Gen que codifica para la Apolipoproteína E
Arlequín	Abreviatura por su nombre en Inglés: <i>An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis</i>
AST	Aspartato aminotransferasas
cHDL	Colesterol de alta densidad (por sus siglas en Inglés cHDL)
cLDL	Colesterol de baja densidad (por sus siglas en Inglés cLDL)
CT	Colesterol Total
EA	Enfermedad de Alzheimer
EC	Éster de colesterol
ECV	Enfermedad Cardio Vascular
FA	Frecuencias alélicas
FL	Fosfolípidos
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés <i>high density lipoproteins</i>)
HELLP	Acrónimo de: Anemia hemolítica, (del inglés <i>Hemolytic anemia</i>), Elevación de enzimas hepáticas (del inglés <i>Elevated Liver enzyme</i>), Trombocitopenia (del inglés <i>Low Platelet count</i>) y/o coagulopatía de consumo
HSPGs	Proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs, por sus siglas en inglés de <i>heparan sulfate proteoglycans</i>)
HW	Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de confianza
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IL	Interleucina
IM	Infarto Agudo de Miocardio

oxLDL	Colesterol de baja densidad oxidado (por sus siglas en Inglés oxLDL)
PE	Pre-eclampsia
PGL2	Prostaglandina 2
QMs	Quilomicrones
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés <i>low density lipoproteins</i>)
Lp(a)	Lipoproteína (a) o Lp(a) o " <i>sinking Pre-beta</i> "
LRP	receptor de Lipoproteínas de baja densidad
MB	Material biológico
NO	Óxido Nítrico
OR	<i>Odds Ratio</i>
PA	Presión arterial
PAD	Presión Arterial Diastólica
PAS	Presión arterial Sistólica
PON	Paraxonasa
RIQ	Rango intercuantílico
RR	Riesgo relativo
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple (por sus siglas en Inglés <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
Stata	Abreviatura por su nombre en Inglés: <i>Data Analysis and Statistical Software</i> .
TAG	Triacilglicerol
TAGs	Triacilgliceroles (Triglicéridos)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TLRs	Receptores tipo Toll
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés <i>very low density lipoproteins</i>)

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
TABLA DE CONTENIDO	8
1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	18
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. ANTECEDENTES	22
3.1 LÍPIDOS, LIPOPROTEÍNAS Y APOLIPOPROTEÍNAS	22
3.1.1 Lípidos	22
3.1.2 Lipoproteínas	24
3.1.3 Apolipoproteínas	26
3.2 APOLIPOPROTEÍNA E	30
3.3 GEN APOE	33
3.4 APOLIPOPROTEÍNA E, GEN APOE, LÍPIDOS y ENFERMEDAD	36
3.5 APOE y RIESGO CARDIOVASCULAR	39
3.6 PRE-ECLAMPSIA	42
3.6.1 Pre-eclampsia, problema complejo de salud pública	42
3.6.2 Fisiopatología de la Pre-eclampsia	43
3.6.3 Impacto de la Pre-eclampsia sobre el riesgo cardiovascular	45
3.6.4 Pre-eclampsia y Lípidos	47
3.7 ESTUDIO GENPE: GENÉTICA & PRE-ECLAMPSIA	50
4. OBJETIVOS	52
4.1 OBJETIVO GENERAL	52
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
5. ASPECTOS METODOLÓGICOS	53
5.1 DISEÑO	53

5.2	UNIVERSO	53
5.3	MUESTRA	53
5.4	MANEJO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL ACTUAL ESTUDIO	55
5.5	ANÁLISIS BIOQUÍMICO: CUANTIFICACIÓN DE PERFIL LIPÍDICO Y APOLIPOPROTEÍNA E	56
5.6	ANÁLISIS GENÉTICO	58
5.6.1	Extracción de ADN	58
5.6.3	Genotipificación	60
5.6.4	Método para genotipificación	60
5.7	CONTROL DE CALIDAD DE DATOS	61
5.7.1	Resultados de cuantificación	61
5.7.2	Resultados de Genotipificación	61
5.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
6.	RESULTADOS PARA LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	64
6.1	CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LAS PARTICIPANTES	64
6.1.1	Resultados.	67
7.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	87
	BIBLIOGRAFÍA	95
8.	PRODUCCIÓN ACADÉMICA DURANTE LA MAESTRÍA	116
8.1	PRODUCCIÓN ACADÉMICA	116
8.2	PARTICIPACIÓN EN GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	120
8.3	CURSOS NO FORMALES (RELACIONADOS CON TÉCNICAS PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN)	121
	ANEXOS	123

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Generalidades de las apolipoproteínas.	27
Tabla 2. Cálculo del tamaño de muestra para el estudio.	54
Tabla 3. Técnicas para la cuantificación de los analitos	58
Tabla 4. Características sociodemográficas de las participantes incluidas	64
Tabla 5. Características clínicas de las participantes incluidas	66
Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de la población analizada	68
Tabla 7. Frecuencias Haplotípicas en la población analizada	69
Tabla 8. Frecuencias de los genotipos épsilon	69
Tabla 9. Prueba de normalidad para las variables continuas, mediante Shapiro Wilk	70
Tabla 10. Mediana y Rango Intercuartílico de los fenotipos intermedios controles vs casos	71
Tabla 11. Distribución de los fenotipos intermedios por quintiles y su asociación con PE	72
Tabla 12. Distribución de los fenotipos intermedios por quintiles y su asociación por severidad	74
Tabla 13. Distribución de los indicadores de riesgo cardiovascular en las participantes y su asociación con PE	76
Tabla 14. Distribución por puntos de corte para riesgo cardiovascular en las participantes estudiadas y su asociación con severidad de la PE	77
Tabla 15. Modelo de asociación de los polimorfismo con el fenotipo intermedio.	81

Tabla 16. Modelo de asociación de los polimorfismo con el fenotipo intermedio.	81
Tabla 17. $\epsilon 2/\epsilon 2$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.	82
Tabla 18. $\epsilon 3/\epsilon 3$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.	82
Tabla 19. $\epsilon 4/\epsilon 4$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.	83
Tabla 20. $\epsilon 2/\epsilon 3$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.	83
Tabla 21. $\epsilon 2/\epsilon 4$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.	84
Tabla 22. $\epsilon 3/\epsilon 4$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.	84
Tabla 23. Asociación entre las variantes épsilon con los fenotipos intermedios y severidad de la PE.	85
Tabla 24. Modelos de asociación de ApoE con los genotipos épsilon y la PE	86
Tabla 25. Media y DE de las dos pruebas realizadas en los tres analitos evaluados.	130
Tabla 26. Valores del perfil lipídico según las dos técnicas analizadas	132
Tabla 27. rs429358 HapMap	136
Tabla 28. rs429358 -100 Genomas	136
Tabla 29. rs7412 HapMap	137
Tabla 30. rs7412 -1000 Genomas	137
Tabla 31. Muestras identificadas como E3, E2 ó E4, según las Tm	142

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Composición de las apolipoproteínas.	25
Figura 2. Apolipoproteína.	25
Figura 3. Isoformas de ApoE y sus propiedades.	31
Figura 4. Gen APOE e isoformas proteicas.	34
Figura 5. Estructura de la Apolipoproteína $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. Identificando los cambios generados por el polimorfismo rs429358.	38
Figura 6. Promedio obtenido entre los valores obtenidos por ambos métodos	135
Figura 7. Mezcla maestra (MasterMix): Todos los componentes son suministrados en el kit.	141

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. ESTÁNDARES DE CALIDAD EN LA COLECCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DEL ESTUDIO GENPE.	124
ANEXO B. CERTIFICADO DE ENTRENAMIENTO RXIMOLA	126
ANEXO C. ESTABILIDAD DE LOS BIOMARCADORES	127
ANEXO D. CONTROL DE CALIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DE LAS TÉCNICAS SELECCIONADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES.	129
ANEXO E. ANÁLISIS DE DESEMPEÑO DE C-LDL MEDIDO (C-LDLM) VERSUS SU ESTIMACIÓN MEDIANTE LA ECUACIÓN DE FRIEDWALD (C-LDLC).	134
ANEXO F. POLIMORFISMO RS429358 Y RS7412	136
ANEXO G. SELECCIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA GENOTIPIFICACIÓN	139
ANEXO H. FLUJOGRAMA PROCESO DE SELECCIÓN DE MUESTRAS	144
ANEXO I. CERTIFICADO CONGRESO. ESTÁNDARES DE CALIDAD PARA COLECCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	145
ANEXO J. CERTIFICADO CONGRESO. REVISIÓN DE GUÍAS, NORMAS JURÍDICAS Y ÉTICAS PARA BIOBANCOS	146
ANEXO K. CERTIFICADO CONGRESO. ESTABILIDAD DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS A1, B Y E.	147
ANEXO L. CERTIFICADO CONGRESO. ECUACIÓN FREDEWALD FRENTE A CUANTIFICACIÓN DEL C-LDL	148
ANEXO M. CERTIFICADO CONGRESO. NIVELES SÉRICOS DE APOLIPOPROTEINA E ASOCIADOS A PRE-ECLAMPSIA	149

ANEXO N.	CERTIFICADO CONGRESO. ASOCIACIÓN ENTRE FRACCIONES LIPIDICAS Y PRE-ECLAMPSIA	150
ANEXO O.	CERTIFICADO CONGRESO. NIVELES SÉRICOS DE SPOLIPOPROTEÍNAS ASOCIADAS A PRE-ECLAMPSIA	151
ANEXO P.	CERTIFICADO CONGRESO. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y NIVELES SÉRICOS DE APOE	152
ANEXO Q.	CERTIFICADO CONGRESO. ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y NIVELES DE APOLIPOPROTEINA E Y PRE-ECLAMPSIA EN GESTANTES COLOMBIANAS	153
ANEXO R.	CERTIFICADO DE PASANTÍA	154
ANEXO S.	BIOMARCADORES ASOCIADOS A RIESGO DE SINDROME METABÓLICO: ESTUDIO EN PERSONAL MÉDICO Y ADMINISTRATIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNAB	155
ANEXO T.	SERUM CONCENTRATIONS OF ANGIOGENIC FACTORS AS PREDICTORS OF SEVERITY OF PREECLAMPSIA IN COLOMBIAN POPULATION.	156
ANEXO U.	ARTÍCULOS. VARIABLES PRE-ANALÍTICAS QUE AFECTAN LA CUANTIFICACIÓN SÉRICA DE PROTEÍNA C REACTIVA E IL-6 EN PRIMIGESTANTES PREECLÁMPTICAS Y CONTROLES SANOS	157

RESUMEN

TÍTULO: IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS RS429358 Y RS7412 DE LA APOE, SOBRE LOS COMPONENTES DEL PERFIL LIPÍDICO, LOS NIVELES SÉRICOS DE APOLIPOPROTEÍNA E Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE PRE-ECLAMPSIA EN POBLACIÓN COLOMBIANA.*

AUTOR: ELIZABETH GUÍO MAHECHA**

Palabras clave: Pre-eclampsia, polimorfismos genéticos, lípidos, apolipoproteína E.

Introducción. La Pre-eclampsia (PE), es una enfermedad multifactorial. Se caracteriza por hipertensión arterial de nueva aparición y proteinuria después de la semana 20 de gestación. Alteraciones en niveles de apolipoproteína E (ApoE), conducen a estrés oxidativo, siendo éste un mecanismo en el desarrollo de PE. Los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen APOE, juegan un papel importante en el metabolismo de lípidos. El presente estudio evaluó la asociación entre polimorfismos, niveles séricos de colesterol total, cHDL, cLDL, TAG y ApoE con el riesgo de PE.

Materiales y métodos. Estudio colombiano poblacional que incluyó 843 casos y 987 controles, captadas por el estudio GenPE (www.genpe.org). La identificación de genotipos se realizó por Kit LightMixApoE® (Roche), para los rs429358/rs7412. Los niveles séricos de cHDL, cLDL, TAG y ApoE fueron cuantificados en equipo RxImola (Randox®). Se realizó análisis descriptivo de las frecuencias alélicas y genotípicas (Arlequín 3.5.1.2); análisis multivariado y regresión lineal para asociación genotipos, niveles y PE (STATA 12.0). Estudio aprobado por el Comité de Ética en Investigaciones de la UNAB.

Resultados. Niveles de ApoE ≥ 5 mg/dl se asocian de manera independiente con PE con OR=2,31 (IC 95% de 1,41-3,78); asociación que se mantiene por severidad, PE leve: OR=1,92 (IC 95% 1,11-3,32), PE severa: OR=2.83 (IC 95% 1,48-5,40), HELLP: OR=3,39 (IC 95% 1,37-8,38). Así mismo, se encuentra asociación con TAGS, con incremento de 23 mg/dl ($p<0.001$) en casos con respecto a controles. No se encontraron genotipos asociados a la enfermedad, ni a los niveles séricos.

Conclusiones. Aumento en los niveles de ApoE y TAGs se asocian con PE y su severidad en la población analizada, reforzando la hipótesis que el metabolismo alterado de los lípidos conduce a estrés oxidativo e inflamación como posible patogénesis en la PE.

*Trabajo de grado

**Universidad Industrial De Santander, Facultad De Salud, Escuela De Medicina. Escuela De Laboratorio Clínico Bacteriología. Director: MANTILLA MORA Gerardo. Bact, MSc. Co-director: SERRANO DÍAZ Norma. MD, MSc.

ABSTRACT

TITLE: IMPACT OF APOE POLYMORPHISMS (RS429358 AND RS7412) ON THE LIPID PROFILE, LEVELS OF APOLIPOPROTEIN E, AND ITS PRESENCE IN A POPULATION OF COLOMBIAN WOMEN WITH PREECLAMPSIA.*

AUTHOR: ELIZABETH GUÍO MAHECHA**

Keywords. Pre-eclampsia, genetic polymorphisms, lipids, apolipoprotein E.

Introduction. Pre -eclampsia (PE) is a multifactorial disease that is characterized by new onset hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation. Alterations in apolipoprotein E (ApoE) levels lead to oxidative stress, an important mechanism in the development of PE. The rs429358 and rs7412 polymorphisms of the APOE gene play an important role in lipid metabolism. This study evaluated the influence of these polymorphisms, levels of total cholesterol, HDL, LDL, TAG and ApoE in the risk of developing PE.

Materials and methods. Colombian population study that included 843 patients with PE and 987 controls, participants of the GenPE study (www.genpe.org). Genotype identification was performed using the LightMixApoE R158C C112R Kit (Roche) for the identification of rs429358/rs7412. Levels of HDL, LDL, TAG and ApoE were quantified in RxImola equipment Randox®). For these purposes, a descriptive analysis of the allelic and genotypic frequencies (Arlequin 3.5.1.2) was conducted and multivariate analysis and linear regression was carried out to assess the association among genotypes, the levels of the markers, and PE (STATA 12.0). The Research Ethics Committee of UNAB approved this study.

Results. ApoE levels ≥ 5 mg/dl were independently associated with PE with OR=2.31 (IC 95% 1.41-3.78); association maintained by severity, mild PE: OR=1.92 (IC 95%, 1.1-3.32), severe PE: OR=2.83 (IC 95% 1.48-5.40), and HELLP: OR=3.39 (IC 95% 1.37-8.38). In addition, an association with TAGs was found, increased to 23 mg/dl ($p < 0.001$) in patients with PE when compared to the controls. The ApoE genotype was not associated with disease severity or the APOE levels in serum.

Conclusions. Increased ApoE and TAGs levels were associated with PE and disease severity in the studied population. These results suggest that the altered lipid metabolism plays a role in the oxidative stress and inflammation as possible pathogenesis in the PE.

*Degree Paper

**Universidad Industrial De Santander, Facultad De Salud, Escuela De Medicina. Escuela De Laboratorio Clínico Bacteriología. Director: MANTILLA MORA Gerardo. Bact, MSc. Co-director: SERRANO DÍAZ Norma. MD, MSc.

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Pre-eclampsia (PE), es una enfermedad compleja exclusiva de la gestación humana, que se presenta en todos los grupos étnicos, con una frecuencia de 3.7%. A nivel mundial es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad tanto fetal como materna (1; 2). Clínicamente la PE se caracteriza por hipertensión arterial de nueva aparición y proteinuria, posterior a la semana 20 de gestación, siendo más frecuente en mujeres jóvenes nulíparas y en mujeres multíparas mayores (3; 4). En las últimas décadas se ha acumulado evidencia científica que sugiere que las mujeres con antecedentes de PE, tienen en el futuro el doble de riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV), en comparación con mujeres que han tenido embarazos normotensos (5).

A pesar de ser una de las principales causas de la morbilidad y la mortalidad materna y fetal, su etiología y la patogénesis de la PE aún no se han dilucidado totalmente. Hasta la fecha, la disfunción endotelial en la vasculatura de la placenta se considera la teoría con mayor aceptación para explicar la enfermedad (6). Varios factores con alta plausibilidad biológica, que incluyen, factores genéticos, inmunes, vasculares y el estrés oxidativo, se han asociado en la patogénesis de la enfermedad, por lo tanto han sido objeto de investigación en búsqueda de marcadores biológicos que permitan predecir la enfermedad (7).

Los estudios, en el campo de la investigación cardiovascular, han demostrado que los lípidos circulantes en suero tienen un efecto directo sobre la función endotelial y como consecuencia, alteraciones en el perfil lipídico se asocian con disfunción endotelial (8). Resultados de investigación sugieren que el metabolismo anormal de los lípidos, en especial concentraciones elevadas de lipoproteínas ricas en triglicéridos se asocian con el estrés oxidativo y disfunción endotelial, y pueden predisponer al desarrollo de PE (9). De manera más reciente, se ha involucrado a

la apolipoproteína E (ApoE), componente importante de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), cuya función consiste en la modificación de las respuestas inflamatorias, y la eliminación del exceso de colesterol de la circulación a través de la regulación de la captación hepática, como un biomarcador novedoso de riesgo para predecir PE. Sin embargo, los resultados reportados no han sido concluyentes y en algunos casos contradictorios (10; 11; 12).

Algunas variantes genéticas que codifican para la ApoE, se han asociado con alteraciones en los niveles séricos de lípidos y apolipoproteínas, en esta misma vía han sido relacionadas de manera contundente con un incremento en el riesgo de ECV (13), constituyéndose, en un marcador con alta plausibilidad biológica en el desarrollo de PE. Sin embargo, los estudios realizados son pocos, con limitación en el tamaño muestral y con resultados contradictorios (14; 15).

Por lo tanto, el presente estudio fue diseñado con el objetivo de investigar la asociación entre los polimorfismos de la APOE, los niveles de colesterol total (CT), colesterol de alta densidad (cHDL), colesterol de baja densidad (cLDL), Triacilglicerol (TAG), y apolipoproteína E (ApoE), con la presencia de PE en mujeres colombianas captadas por el Estudio GenPE.

1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe asociación entre los polimorfismos de APOE (rs429358 y rs7412) y los niveles séricos de CT, cHDL, cLDL, TAG y ApoE, con el riesgo de desarrollar pre-eclampsia en mujeres colombianas?

2. JUSTIFICACIÓN

A la fecha no existen intervenciones aceptadas como efectivas para la “prevención” de la PE, por lo tanto, su manejo está encaminado a disminuir posibles complicaciones en la madre y el feto con intervenciones, como el uso del sulfato de magnesio y/o la terminación temprana del embarazo, para prevenir muertes maternas. Esto ha llevado a que la inducción del parto pre-término debido a PE, se haya incrementado de manera importante en las últimas 4 décadas, posicionando a la PE como una de las principales causas de parto pre-término y de bajo peso al nacer y por ende de alta morbi-mortalidad tanto materna como perinatal (16).

La implementación rutinaria de la terminación temprana del embarazo por PE ha servido para disminuir, en gran parte, el riesgo de muerte materna entre las mujeres que desarrollan PE leve o tardía. Sin embargo, existe un considerable grupo de mujeres de alto riesgo dentro del espectro de la PE cuya presentación clínica es más abrupta y severa, y a edades gestacionales más tempranas: PE severa, eclampsia y síndrome HELLP, siendo este grupo el principal responsable de las 40,000 muertes maternas asociadas a los desórdenes hipertensivos del embarazo, de las cuales América Latina y el Caribe tienen la proporción más alta en el ámbito mundial (17). De igual manera, estas presentaciones de PE tienen un mayor impacto sobre la morbi-mortalidad del recién nacido y sobre el futuro riesgo de enfermedades cardiovasculares en la madre en etapas posteriores de su vida de adulta (18). Por lo anterior se hace necesario el desarrollo de intervenciones encaminadas a la prevención de la PE para lograr una reducción más significativa en la morbi-mortalidad materna y neonatal, puntos que contribuyen con el IV y V Objetivos de Desarrollo del Milenio: reducir la mortalidad infantil y mejorar la salud materna (19).

Pero el desarrollo de intervenciones preventivas requiere de un conocimiento sobre la etiología y la fisiopatología de la enfermedad. En PE hay vacíos en el conocimiento y la etiología de la enfermedad es aún desconocida. La hipótesis que con mayor fuerza fundamenta su origen, es una falla muy temprana en la placentación que lleva a la liberación de varios productos placentarios provocando trastornos en la madre, tales como: estrés oxidativo, respuesta inflamatoria incrementada y disfunción endotelial generalizada, que afecta también el adecuado crecimiento del árbol vascular placentario. El modelo genético más plausible hasta la fecha postula que la aparición del fenotipo patológico en PE depende de la susceptibilidad genética y medio-ambiental de la madre y de la carga genética del trofoblasto (carga genética fetal) (20).

Existe evidencia de la heredabilidad de la PE, los estudios familiares han demostrado que ésta patología es más común entre las hijas y hermanas de mujeres con antecedente de PE (21; 22; 23; 24). Sin embargo, el grado en que los genes y las vías genéticas contribuyen en el desarrollo de la enfermedad, sigue siendo motivo de investigación. Un meta-análisis, publicado recientemente, reportó 7 variantes en 6 genes que se asociaron significativamente con PE. Algunas de estas variantes también son factores de riesgo independientes para ECV, para dislipidemia genética y están involucrados en el metabolismo de los lípidos (25). Las mujeres con antecedente de PE tienen un riesgo incrementado para ECV y para desarrollar dislipidemia más tarde en la vida, lo cual sugiere una etiología compartida entre PE y alteraciones en el metabolismo de los lípidos y ECV. Los patrones más comunes de dislipidemia encontrados en embarazos con PE, han sido niveles elevados de TAGs y niveles bajos de cHDL (26; 27; 28).

Los niveles de lípidos indicativos de dislipidemia en la circulación, han sido implicados en la patogénesis de la disfunción endotelial y en la aterosclerosis (29). Dado que, una de las características clásicas de PE es la disfunción endotelial, la dislipidemia se convierte en un candidato plausible en la patogénesis de la

enfermedad y por lo tanto la evaluación de variantes genéticas asociadas a los niveles circulantes de lípidos podría ayudar a dilucidar la fisiopatología de la PE.

Los resultados de este estudio, con un tamaño de muestra robusta, aportan al conocimiento sobre los mecanismos involucrados en el desarrollo de una enfermedad con alto impacto social y económico. El encontrar resultados positivos de asociación, abre la posibilidad de plantear el desarrollo de ensayos clínicos aleatorizados que investiguen la eficacia de hipolipemiantes, por ejemplo estatinas, para la prevención de PE.

3. ANTECEDENTES

3.1 LÍPIDOS, LIPOPROTEÍNAS Y APOLIPOPROTEÍNAS

Los trastornos del metabolismo y del transporte de los lípidos y las lipoproteínas han sido estudiados en las últimas décadas, comprobando que los defectos en su regulación están fuertemente asociados con el desarrollo de condiciones patológicas, tales como, el síndrome metabólico, ECV, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer), e incluso el desarrollo de tumores (30; 31).

3.1.1 Lípidos. Los lípidos son un grupo de biomoléculas muy heterogéneas desde el punto de vista estructural. La mayoría de estas moléculas son hidrofóbicas y sus funciones biológicas son casi tan variadas como su estructura. Están involucrados en varios mecanismos biológicos, como: reserva energética en los tejidos, transporte, señalización y clasificación de macromoléculas (31; 32).

- Clasificación de los lípidos:

La clasificación de los lípidos es compleja debido a su diversidad estructural y funcional, por lo tanto no existe una forma única de clasificación (33). A continuación se describe un tipo de clasificación, la cual se fundamenta en los lípidos más importantes en el metabolismo humano.

- *Lípidos simples*: Están formados por las unidades estructurales de naturaleza altamente ácida o alcohólica, tienen efectos importantes sobre el metabolismo intracelular (34); en este grupo se encuentra:
- *Unidades estructurales no esterificadas*: ácidos grasos y alcoholes grasos

- *Ésteres*: monoglicéridos, diacilglicéridos y triacilglicéridos o grasas neutras (35).
- *Derivados de ácidos grasos de importancia reguladora*: prostaglandinas, tromboxano y leucotrienos (34).
- *Lípidos complejos*: Son los lípidos en los que existen unidades estructurales de las anteriores (lípidos simples), pero unidas por enlaces éster con algún otro componentes de naturaleza polar, como fosfato, alcoholes e hidratos de carbono hidrofílicos y tienen características anfipáticas (una parte hidrófoba y una hidrofílica), que los hacen adecuados para formar bicapas de forma espontánea (33; 34). Forman parte de este grupo:
 - *Fosfolípidos*: Cuentan con la presencia de algún fosfato. Se clasifican en fosfoacilglicéridos y esfingomielinas (36).
 - *Glicolípidos*: Poseen siempre esfingosina y además algún hidrato de carbono en su molécula. Existen tres tipos principales: Cerebrósidos, globósidos y gangliósidos. Algunas veces el hidrato de carbono contiene ésteres sulfúricos, por lo que el lípido se denomina sulfátido o sulfolípido (33; 34).
 - *Lípidos conjugados con macromoléculas*: Lipoproteínas y lipopolisacáridos (33).
 - *Lípidos isoprenoides o insaponificables*: Se derivan estructuralmente de isopreno o 2-metil-butadieno y no contienen enlaces éster (33; 35), se clasifican en:

Terpenos y aroma.

Esteroides
Retinoides y carotenoides
Tocoferoles
Polipenilquinonas.

Además, en los tejidos existen otros lípidos, que se generan por modificaciones o solapamientos entre los tres grupos anteriores, entre ellos están:

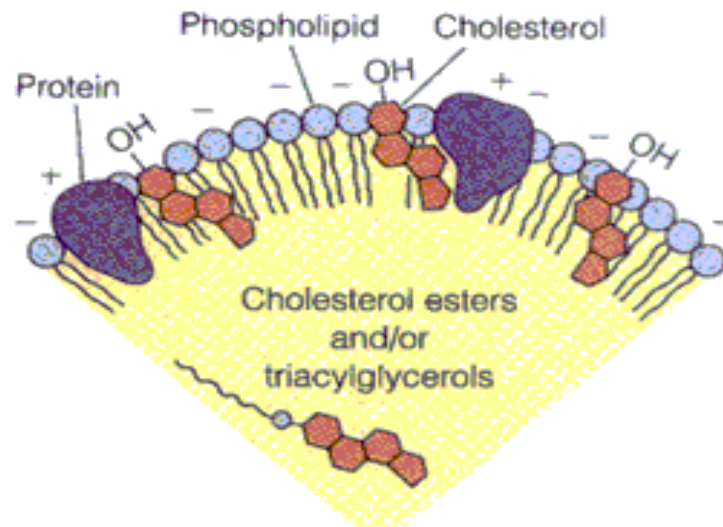
Esteres de colesterol
Plasmalógenos
Éteres glicéricos o pequeñas cantidades de hidrocarburos (33; 35).

3.1.2 Lipoproteínas. Los lípidos exógenos y endógenos deben ser transportados a los diferentes tejidos u órganos, ya sea para ser almacenados, utilizarlos como fuente de energía o convertirlos en productos especializados (ácidos biliares, hormonas esteroideas, etc.), pero debido a que son insolubles en agua su transporte por el plasma resulta complejo (37).

Las lipoproteínas son macromoléculas, de naturaleza globular, cuya función es empaquetar los lípidos insolubles en el medio acuoso del plasma y transportarlos desde el intestino y el hígado a los tejidos periféricos y, desde éstos, devolver el colesterol al hígado para su redistribución, o eliminación del organismo en forma de ácidos biliares fundamentalmente (34).

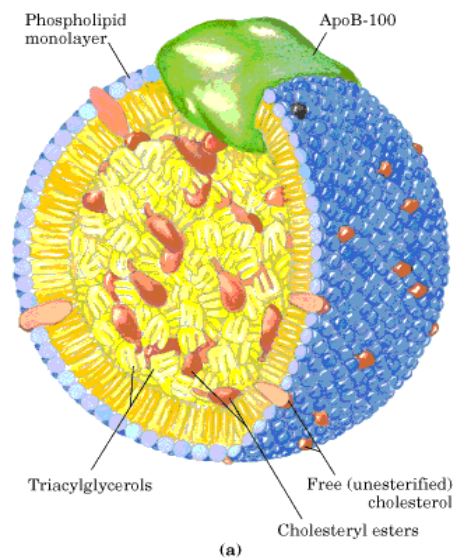
Las lipoproteínas plasmáticas constituyen un sistema disperso y heterogéneo de partículas de morfología casi esférica, que tienen un núcleo o *core* hidrófobo formado por lípidos no polares, es decir, colesterol esterificado y TAG, y por una capa superficial hidrófila que contiene colesterol no esterificado, fosfolípidos (FL) y unas proteínas específicas denominadas apolipoproteínas (Apo) (33; 34) (ver figura 1 y 2).

Figura 1. Composición de las apolipoproteínas.



Fuente: Mathews. Van Holde. Bioquímica. Tercera edición. 2005

Figura 2. Apolipoproteína.



Fuente: Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth edition. 2008 W.H. Freeman and Company

La nomenclatura de las diferentes lipoproteínas presentes en el plasma humano se basa en el hecho de que están catalogadas dentro de rangos de densidades y

ésta a su vez depende de la relación lípido/proteína (33). Cada clase posee determinada movilidad electroforética, lo que ha permitido clasificarlas en:

Quilomicrones (QMs): Transportador de TAG

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL): Transportador de TAG

Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL).

Lipoproteínas de baja densidad (LDL): Transporte de éster de colesterol (EC)

Lipoproteína (a) o Lp(a) o “*sinking Pre-beta*”

Lipoproteínas de alta densidad (HDL): Transporte reverso de EC.

3.1.3 Apolipoproteínas. Las Apolipoproteínas cumplen un papel estructural en las partículas lipoprotéicas, e intervienen en el metabolismo de las mismas, actuando como moduladores de actividad enzimática y ligando para los receptores celulares específicos (38). Actualmente son conocidas las Apo: A, B, C, D, E, F y G; algunas de estas presentan isoformas que se indican con números romanos.

En la tabla 1 se describen las características, el peso molecular y el lugar de origen de las apolipoproteínas:

Tabla 1. Generalidades de las apolipoproteínas.

Apolipoproteína	Peso molecular (kDa)	Lipoproteína	Características	Lugar de origen
A-I	28.016	HDL, QMs	Cromosoma 11 Activa la LCAT Ligando para el receptor del HDL.	Intestino, Hígado
A-II	17.014	HDL, QMs	Cromosoma 1. Forma complejos (puentes disulfuro), con ApoE inhibiendo su unión al receptor de lipoproteínas. Inhibidor de LPL.	Hígado
A-IV	46.000	Secretado con QMs, se transfiere a HDL	Cromosoma 11 Transferencia de Apos	Intestino
B-48	264.000	QMs	Cromosoma 2	Intestino
B-100	540.000	LDL, VLDL, IDL	Cromosoma 2 Ligando más importante para receptor de LDL.	Hígado
C-I	6.630	VLDL, HDL, QMs	Cromosoma 19. Activa la LCAT y la LPL Inhibe CETP	Hígado
C-II	8.900	VLDL, HDL, QMs	Cromosoma 19 Activa LPL	Hígado
C-III	8.800	VLDL, HDL, QMs	Cromosoma 11 Inhibe la LPL y la captación hepática de QMs	Hígado
E	34.145	VLDL, HDL, QMs	Cromosoma 19 Ligando para el receptor de las LDL	Diferentes tejidos (macrófagos y neuronas)
(a)	Variable	Enlace covalente con ApoB-100 de LDL	Cromosoma 6 Modulador procesos de fibrinólisis, síntesis hepática	Hepatocitos-secretada a plasma

Tomado de Bioquímica de Harper (32)

– Metabolismo de las lipoproteínas

Las lipoproteínas son una familia de proteínas plasmáticas, que permiten el transporte de los lípidos por los líquidos biológicos, sangre y linfa (30). Los lípidos se empaquetan dentro de los QMs, que por lo general contienen fosfolípidos, principalmente en la superficie, y los TAGs y EC en la parte central. La superficie contiene varias proteínas de anclaje, llamadas apolipoproteínas, el principal componente de las Apo en los QMs es ApoB48, junto con ApoC, ApoAI y ApoAIV. La traducción de ApoB48, que tiene lugar en la membrana del RE, depende estrictamente de la presencia de la proteína de transferencia microsomal de TAGs (MTP) y de una cantidad suficiente de lípidos (33). La MTP transfiere TAGs a la Apo B, ayudando a la formación de una estructura plegable más favorable para almacenar grandes cantidades de lípidos. Esta vía conduce a la producción de QMs que inicialmente proporciona fosfolípidos y externamente lípidos neutros, y posteriormente se cargan con TAGs recién sintetizados y EC (30; 35). Junto con los TAGs, los QMs llevan cantidades relevantes de colesterol; sin embargo, el colesterol libre también puede transportar de vuelta al lumen intestinal por medio del casete G5 y 8 de unión a la ATP (ABCG5 y ABCG8), y puede ser secretado a través de la vía de HDL, que implica la participación de ApoAI y ABCA1. Este transportador juega un papel muy importante para el transporte de colesterol a través de la vía de HDL, incluso si no está implicado en la vía de los QMs (30; 39).

La estrecha relación entre los lípidos plasmáticos, particularmente EC y la pared vascular está bien documentado. Dentro de la pared vascular, EC se acumula en forma de pequeñas gotas en el citosol o en los lisosomas (32). Normalmente, las partículas de LDL que se infiltran y atraviesan el endotelio, contienen un núcleo rico en EC y el ácido linoléico poliinsaturado. Las partículas de LDL enriquecidas con oleato de colesterol monoinsaturada son generalmente más grandes que las partículas de LDL enriquecidas con linoleato de colesterol poliinsaturadas, y se unen a los proteoglicanos arteriales con mayor fuerza por estar atrapados y obligados a seguir la vía que conduce a la formación de placa aterosclerótica. Los

lípidos son capaces de unirse a los receptores tipo Toll (TLRs) y pueden iniciar la señalización intracelular (32; 34). Los TLRs pueden ser aterogénicos o proaterogénicos. Seimon et al, observó que los fosfolípidos oxidados, partículas LDL oxidadas, y ácidos grasos saturados activan la apoptosis en macrófagos en el retículo endoplasmático estresado a través de un mecanismo que involucra TLRs. Por otra parte, la eliminación de lípidos a partir de placas en circulación puede ser realizada por las HDL (32).

El metabolismo de las HDL, tiene como función recuperar el exceso de colesterol depositado en las membranas celulares de los tejidos periféricos, convirtiéndolos en EC y los remiten a las formas maduras y terminales de las otras lipoproteínas, especialmente aquellas ricas en TAG (QMs, IDL y LDL), muchas de estas, terminan depositándolo en el hígado. Por tanto, las HDL son fundamentales en el transporte inverso del colesterol o ruta de excreción para este compuesto, que al circular siempre unido a proteínas plasmáticas no puede ser expulsado por orina (34; 40).

Tanto los estudios experimentales como los epidemiológicos, genéticos y clínicos, indican que los niveles de cHDL se correlacionan en forma independiente e inversa con la presencia de enfermedad cardiovascular, indicando que las HDL constituyen un factor protector antiaterogénico. Por otro lado, niveles reducidos de cHDL constituyen la anomalía lipídica más prevalente en sujetos con enfermedad coronaria precoz (41).

Existe un creciente interés en investigar las propiedades funcionales de las HDL, por ser considerados factores protectores de riesgo cardiovascular. Sin embargo, la evidencia también sugiere que la funcionalidad del HDL como atero-protector puede ser perdida en un ambiente de inflamación y estrés oxidativo, y su condición cambiar de atero-protector a una forma disfuncional de HDL, proaterogénica (40).

3.2 APOLIPOPROTEÍNA E

La apolipoproteína E (ApoE), es una proteína multifuncional con un papel central en el metabolismo lipídico, en neurobiología, en enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (38). Tiene tres isoformas principales (ApoE2, ApoE3 y ApoE4), con diferentes efectos sobre transporte de los lípidos y la homeostasis del colesterol en los sistemas cardiovascular y nervioso central (42; 43).

Descubierta en la década de 1970, es una de las varias apolipoproteínas asociadas a lipoproteínas remanentes, VLDL, IDL, QMs y ciertas subclases de HDL. ApoE desempeña un papel clave en la regulación de estas lipoproteínas en el plasma al servir como el ligando por su unión a receptores específicos de la superficie celular, incluyendo los miembros de la familia del receptor de LDL y proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs, por sus siglas en inglés de *heparan sulfate proteoglycans*) (44).

Las lipoproteínas remanentes son el resultado del catabolismo de los QMs y de las VLDL. La lipoproteína lipasa, tiene como actividad degradar los TAGs de las proteínas precursoras, disminuyendo su tamaño y aumentando el contenido de colesterol (45). Este proceso produce partículas de composición y tamaño variable, las cuales son capaces de atravesar el endotelio vascular, y ser arrestadas por los monocitos formando células espumosas donde el colesterol se puede depositar, si no existen mecanismo de control. Si bien el catabolismo depende de la actividad de lipasa hepática, la captación de éstas, está mediada por ApoE, que es reconocida por los receptores específicos (46; 47; 48; 49).

ApoE3, es la más común de las tres isoformas y se considera que es la forma silvestre o normal. ApoE2 y apoE4 difieren de ApoE3 por sustituciones de un solo aminoácido en la posición 112 o 158 (50; 51) (Figura 3).

Figura 3. Isoformas de ApoE y sus propiedades.

Apolipoprotein E Isoforms			
	E4 ←	E3	→ E2
Allelic frequency:	15%	77%	8%
Sequence differences:	Arg-112 Arg-158	Cys-112 Arg-158	Cys-112 Cys-158
Receptor binding:	100%	100%	<2%
Associated disorder:	Alzheimer's Disease	"Normal"	Type III Hyperlipoproteinemia

Tomado de: Y. Huang, R.W. Mahley / *Neurobiology of Disease* 72 (2014) 3–12 (51)

ApoE se sintetiza y secreta a partir de una variedad de tejidos y varios tipos de células, siendo muy abundante en el líquido intersticial, linfa y plasma. ApoE puede ser secretada por las células, en una forma pobre en lípidos. Sin embargo, debido a su gran afección por los lípidos, especialmente fosfolípidos, casi siempre se encuentra asociada a ellos y muy probablemente los adquiere de la superficie celular. En linfa, plasma y líquido cefalorraquídeo, siempre parece estar asociada con lípidos. Estudios realizados en ratones, monos tíj y seres humanos han demostrado que los hepatocitos son el principal sitio de síntesis de ApoE. La producción de ApoE también se detecta fácilmente en el cerebro, glándula suprarrenal, testículos, piel, riñón, bazo, tejido adiposo y macrófagos. La presencia de ApoE es crítica para eliminar del plasma lipoproteínas ricas en TAGs y colesterol como remanentes de quilomicrones, VLDL, LDL y una subclase de las

HDL. Esta Apo es el principal ligando del receptor de LDL y también se une a otros receptores relacionados (52; 53; 54; 55).

ApoE posee dos dominios estructurales que están conectados por 20 a 30 aminoácidos que sirven como una bisagra entre ellos. Los dos tercios del dominio N-terminal contiene la región de unión al receptor (56). La región entre los aminoácidos 136-150, contiene de 6 a 8 residuos críticos de arginina y lisina y una histidina, que median la interacción al ligando del receptor de LDL (46; 48; 49). Una arginina, ubicada en la posición 158, parece estar implicada en la modulación de la conformación de la región de 136-150 y por lo tanto, participa de manera indirecta en la actividad de unión al receptor. Las ApoE3 y ApoE4, muestran actividad normal de unión al receptor por tener este residuo de arginina en el posición 158, mientras que la ApoE2, es defectuosa en la actividad de unión al receptor, pues tiene en la posición 158 una cisteína a cambio de una arginina (46; 48; 49).

Varios mutantes de origen natural de ApoE han ayudado a definir la región de unión al receptor. Las sustituciones de aminoácidos en los residuos 136, 142, 145, 146, dan como resultado una unión defectuosa al receptor y se asocian con el desarrollo de hiperlipoproteinemia tipo III (46; 49). Las mutaciones en los residuos 136, 142, y 145 involucran la sustitución de un aminoácido neutro por la arginina. Las mutaciones en el residuo 146 implican la sustitución de un aminoácido neutro, glutamina o glutamato, por lisina. La sustitución en el residuo 158 arginina por cisteína, que da lugar a la variante común ApoE2, la cual tiene una unión defectuosa al receptor de LDL, que se asocia con la forma recesiva de hiperlipoproteinemia tipo III (57; 58)

Los HSPGs de la superficie celular también juegan un papel importante en la unión de lipoproteínas que contienen ApoE, ya sea mediante la unión al LRP, o por otro tipo de receptores, o directamente por HSPGs. Parece que la interacción

de ApoE con HSPGs es un primer paso, necesario para la absorción de QMs por los hepatocitos, mediada por los LRP. Esto se conoce como la vía HSPG-LRP (44). Estudios *in vitro* han demostrado que en ausencia de HSPGs en la superficie celular, las lipoproteínas remanentes que contienen ApoE, no logran unirse al receptor y por lo tanto no pueden ser internalizadas. La vía HSPG-LRP no se limita a la absorción de las lipoproteínas en los hepatocitos; también opera en otras células, incluyendo neuronas. La ApoE secretada de las células, enriquece el entorno extracelular y facilita la unión, con alta afinidad, de las lipoproteínas a HSPGs. Este proceso se ha denominado el papel “secreción/captura” de ApoE y de esta forma lipoproteínas enriquecidas con ApoE son capturadas mediante la unión a HSPGs, para ser reconocidas por los LRP y finalmente lograr ser internalizadas por las células. Alternativamente, HSPGs también puede servir como receptor para la unión directa y la internalización de las lipoproteínas que contienen ApoE, sin necesidad de utilizar los LRP (59).

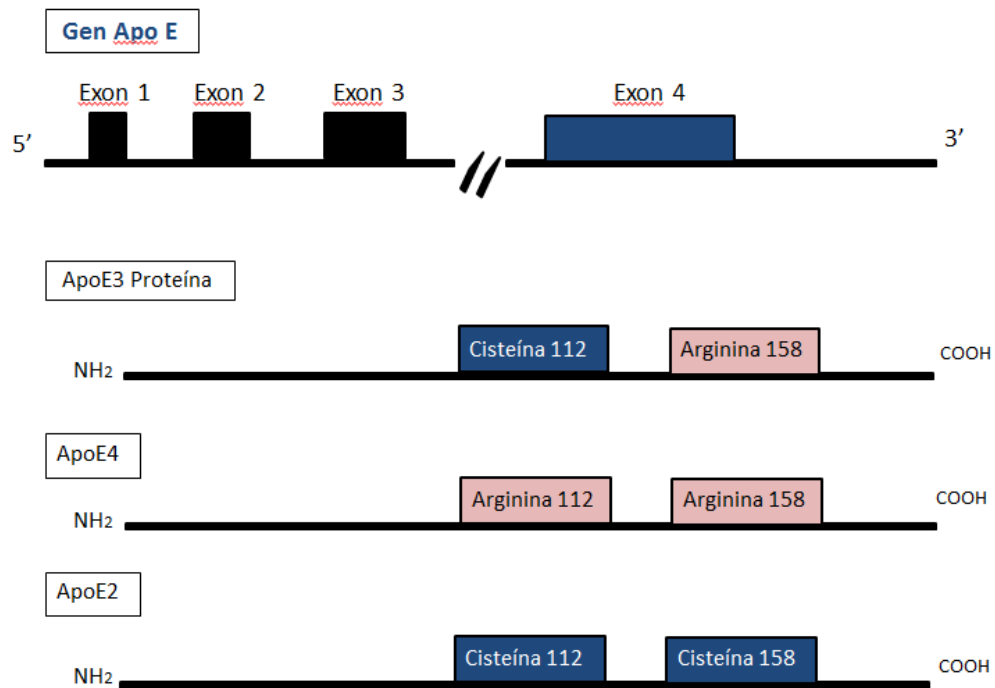
El patrón celular diverso de expresión de ApoE implica múltiples funciones y probablemente papeles distintos en vías fisiológicas y fisiopatológicas. Por lo tanto, el conocimiento de cómo se regula la expresión ApoE en diferentes tipos de células en respuesta a diversos estímulos debe proporcionar información fundamental para entender los efectos de ApoE en las diversas patologías a las cuales se ha asociado, tales como neurodegenerativas (Alzheimer) o cardiovasculares (50).

3.3 GEN APOE

El gen APOE se ubica en el cromosoma 19 locus q13.2-q13.3, entre los pares de bases (pb), 50.100.901 a 50.104.488, con un tamaño de 3597 pb. Está conformado por 4 exones y 3 intrones. Es un gen altamente polimórfico con tres alelos comunes: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, que dan origen a seis genotipos, tres homocitogos y

tres heterocigotos, respectivamente ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$), y estos a su vez genera tres fenotipos o isoformas de la proteína: Apo E2, E3 y E4 (60; 61; 62; 63). Los alelos difieren en dos polimorfismos de un solo nucleótido, dando lugar a diferentes aminoácidos en la respectiva proteína en las posiciones 112 y 158, de la siguiente manera: i) Apo $\epsilon 3$, la forma silvestre, presenta cisteína (TGC) en la posición 112 y arginina (CGC) en la posición 158, ii) Apo $\epsilon 2$, la arginina se sustituye por cisteína en la posición 158 y iii) Apo $\epsilon 4$, la arginina ocupa la posición 112 a cambio de cisteína (60; 62; 63). (Figura 4)

Figura 4. Gen APOE e isoformas proteicas.



Fuente: <http://www.trabajosdistinguidos.com/factores/expertosfactores43.php?PHPSESSID=jrq6tldg3oft1iq06pkokchj26>

Las frecuencias alélicas (FA), pueden variar según la población estudiada, lo cual puede verse reflejado en que tan prevalente es una enfermedad en determinada población. El gen APOE ha sido estudiado en varias poblaciones incluida la colombiana, y se han reportado sus FA con algunas diferencias entre las

poblaciones estudiadas. Arrigo et al, realizaron un estudio en población aborigen y población caucásica de Argentina para determinar las FA, encontrando diferencias significativas entre las poblaciones para los alelos $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. Las FA en población caucásica fueron: $\epsilon 3$ 0,786 (IC 95% 0,679-0,893), $\epsilon 4$ 0,178 (IC 95% 0,078-0,278), mientras que para población aborigen fueron: $\epsilon 3$ 0,880 (IC 95% 0,804-0,956), $\epsilon 4$ 0,084 (IC 95% 0,021-0,147) (64).

En Colombia se han reportado estudios con población de Risaralda y con población del noreste de Antioquia (65; 66). Moreno V y cols., encontraron que las frecuencias en la población colombiana son similares a las indoamericanas, el genotipo $\epsilon 2$ tiene un porcentaje de 1.8 % en colombianos y 1.7% en indoamericanos, la frecuencia de $\epsilon 3$ es 86.3% en nuestra población y 85.9% en la comparada; la presencia de $\epsilon 4$ en indoamericanos es 12.9% que no difiere mucho del 11.9% presente en comunidad colombiana (65). Las frecuencias reportadas para la población “paisa” por Velez-Pardo C et al, son: el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ presentó la frecuencia más alta (66,33%) y el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ la frecuencia más baja (1,89%). Las frecuencias alélicas obtenidas para APOE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, fueron de 0,075 (IC del 95% = 0,063 a 0,086) \pm 0.005, 0.814 \pm 0.009 (0.797–0.831) y 0,111 \pm 0,007 (0,098 a 0,125), respectivamente. Todos los genotipos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (66). Frecuencias que difieren de las reportadas para población de Risaralda.

Un análisis sobre la diversidad de haplotipos, realizado por Fullerton et al. Mostró que el alelo APOE $\epsilon 4$ es el alelo ancestral en los seres humanos, y la divergencia de los $\epsilon 4$ y $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ se produjo hace 200.000 a 300.000 años (50). Estos estudios han sugerido que la APOE $\epsilon 4$ evolucionó en respuesta a los cambios en la dieta, “un gen ahorrativo”, lo que permite la acumulación de grasa cuando el acceso nutricional fluctúa. Otros sugieren que el alelo $\epsilon 4$ evolucionó debido a una respuesta inflamatoria mayor, lo que puede reflejar una adaptación a entornos altamente infecciosos. Y una tercera posibilidad, propone que sea debida a las dos

causas antes expuestas, esto podría explicar las diferencias actuales observadas en la distribución mundial del alelo (50).

En la misma línea de pensamiento, Heubbe et al, sugieren que el alelo $\epsilon 4$ conduce a una mayor absorción intestinal y recaptación renal de la vitamina D. Esta afirmación se base en experimentos en ratones APOE $\epsilon 4$, en los cuales los niveles de vitamina D son significativamente mayores que los ratones APOE $\epsilon 2$ y APOE $\epsilon 3$ (67). Estos hallazgos han sido confirmados en estudios en humanos, donde se logró documentar que los individuos que son $\epsilon 4$ tienen niveles significativamente más altos de vitamina D en comparación con portadores $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ (13-25% más altos). Los investigadores han propuesto varios escenarios posibles para la evolución del alelo $\epsilon 4$, incluyendo que el alelo $\epsilon 4$ evolucionó para proteger contra la deficiencia de vitamina D. Sin embargo, con la evolución de los alelos $\epsilon 3$ y $\epsilon 2$, el alelo $\epsilon 4$ se hizo menos frecuente (68). Hoy en día, la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en las poblaciones humanas de todo el mundo sigue generalmente un gradiente latitudinal en forma de U, con las frecuencias más altas, entre el 40-50% de la población, en latitudes ecuatoriales y las frecuencias más bajas en el latitudes centrales, tendencia que apoyaría la teoría basada en la Vitamina D (50).

3.4 APOLIPOPROTEÍNA E, GEN APOE, LÍPIDOS y ENFERMEDAD

Numerosos estudios, en los últimos 10 años, han investigado la correlación entre polimorfismos del gen APOE y el perfil lipídico, las posibles implicaciones sobre la salud de los individuos y la asociación a patologías donde exista plausibilidad biológica.

Las tres isoformas comunes de APOE, E2, E3 y E4, se traducen en diferentes capacidades de unión al receptor y por lo tanto, el tener la capacidad de modificar los niveles circulantes de colesterol y TAGs. Se estima que el 60% de la variación

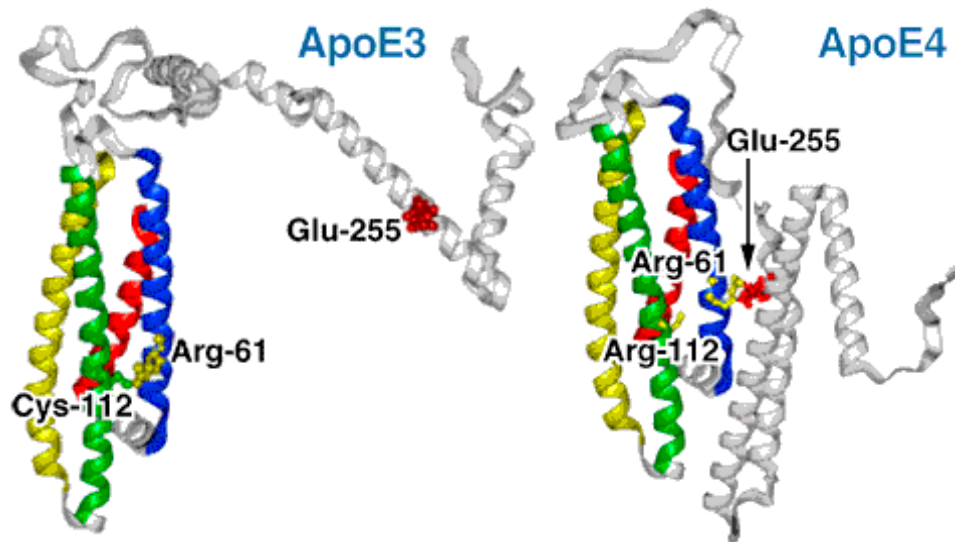
en los niveles plasmáticos de colesterol está determinado genéticamente y que el gen de la APOE aporta el 14% de dicha variación (43). Esta afirmación es apoyada por estudios en diferentes grupos étnicos, en los cuales parece existir acuerdo en que, individuos homocigotos $\epsilon 3$ y los portadores del alelo $\epsilon 2$ tienen niveles circulantes de colesterol más bajos comparados con los portadores del alelo $\epsilon 4$, quienes tienen niveles plasmáticos más altos de CT y de LDL (45).

La Apo $\epsilon 2$ muestra una unión defectuosa con el receptor de las LDL, como resultados, los individuos homocigotos para el alelo $\epsilon 2$ tienen una marcada predisposición a presentar hiperlipoproteinemia tipo III, que se caracteriza por, acumulación de VLDL, hipercolesterolemia, y un mayor riesgo de presentar arterosclerosis prematura. La sola presencia de este alelo ($\epsilon 2$), impone una tendencia para tener niveles altos de TAGs y bajos niveles de cLDL (12). Estudios anteriores han demostrado que en la población general el portar alelo $\epsilon 2$ está asociado con niveles más bajos de colesterol plasmático total, cLDL y ApoB; pero con niveles elevados de TAGs comparado con los portadores del alelo $\epsilon 3$. A diferencia del alelo $\epsilon 4$ que se asocia con niveles incrementados de CT, LDL, ApoB y TAGs (69; 70).

De igual forma, para Apo $\epsilon 4$ se han reportado asociación con alteraciones en el perfil lipídico. La presencia de $\epsilon 4$ conduce a mayores niveles de colesterol y cLDL, lo que lleva a un riesgo de sufrir enfermedad isquémica cardíaca y por consiguiente está asociado con un mayor riesgo de ECV, en comparación con personas $\epsilon 3$ (71). La diferencia en la estructura de $\epsilon 4$ debida a la sustitución en el codón 112, se traducen en cambios en el dominio N-Terminal, haciendo la estructura menos organizada y más expuesta al entorno acuoso; como consecuencia las interacciones entre el dominio N y C-Terminal de la molécula se modifican de modo que a diferencia de $\epsilon 3$, la $\epsilon 4$ se une de preferencia a VLDL, y no con las HDL (Ver figura 5) (12; 72). La Apo $\epsilon 4$ también ha sido ampliamente estudiada asociada con enfermedad de Alzheimer (EA), siendo un factor de riesgo

conocido, que aumenta la ocurrencia y reduce la edad de aparición de la enfermedad. Entre el 65-80% de los casos de Alzheimer son portadores del Apo ϵ 4 (73).

Figura 5. Estructura de la Apolipoproteína ϵ 3 y ϵ 4. Identificando los cambios generados por el polimorfismo rs429358.



Fuente: <http://www2.biodiscover.com/news/pathology/article/85710.htm>

Este tipo de asociaciones, por su relevancia clínica, ha sido estudiado en varias poblaciones, incluyendo la colombiana, aunque con tamaños de muestras pequeños y una cobertura limitada que no representa los diferentes grupos étnicos del país. En el 2005 se realizó un estudio que incluyó 200 adultos sanos colombianos, en los cuales se encontró la siguientes frecuencias para los alelos: ϵ 2=0.05, ϵ 3=0.87 y ϵ 4=0.08, y el genotipo de mayor frecuencia fue ϵ 3/ ϵ 3 (77.1%). Con relación a los niveles circulantes de lípidos, los individuos ϵ 4/ ϵ 3 presentaron niveles más altos de colesterol ($p < 0.05$), comparados con los ϵ 3/ ϵ 2. Estos individuos (ϵ 4/ ϵ 3), también presentaron niveles más altos de TAGs al compararlos con los grupos ϵ 3/ ϵ 3 y ϵ 3/ ϵ 2. Este estudio concluye, basado en sus hallazgos, que ϵ 4 puede intervenir en el incremento de los niveles de CT, cLDL y TAGs y por lo tanto ser un factor de riesgo para ECV (74).

3.5 APOE y RIESGO CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares, son enfermedades complejas y la principal causa de mortalidad, morbilidad y discapacidad en todo el mundo. En el 2008, las ECV fueron responsables de 7,3 millones de muertes a nivel mundial. Además, se estima que los costos directos e indirectos generados por estas enfermedades pueden superar los 400 millones de dólares por año (75). Las ECV se definen como la presencia de enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad arterial periférica, la aterosclerosis aórtica y/o aneurisma. Los esfuerzos para reducir la morbilidad y la mortalidad asociadas a las enfermedades cardiovasculares están dirigidas a la identificación y reducción de los factores de riesgo modificables que predisponen a un individuo al desarrollo de estas patologías. Muchos factores, tanto ambientales como genéticos, se han identificado e implicado en el desarrollo de estas patologías. Los factores de riesgo convencionales (ambientales), tales como, el consumo de tabaco, la baja actividad física, la ingesta de alcohol y el consumo de grasas en la dieta, en particular, la cantidad de ácidos grasos saturados, se han considerados como los principales factores de riesgo el desarrollo de ECV (75; 76; 77; 78).

Los caracteres cuantitativos, representados por los factores de riesgo genético o no convencional, constituyen factores de riesgo intermedios que pueden conducir a las ECV. Por lo tanto, la identificación de genes y combinaciones de variantes de susceptibilidad en genes candidatos, puede desempeñar un papel importante en la prevención primordial, primaria y secundaria. El conocimiento de estos biomarcadores de susceptibilidad también puede proporcionar nuevos conocimientos sobre las vías involucradas en la fisiopatología de la enfermedad y la identificación de blancos terapéuticos, abriendo opciones de nuevas posibilidades de intervenciones farmacológicas (79).

Si bien los factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales, asociados con las ECV son múltiples y con complejas interacciones entre ellos; los niveles circulantes de lípidos, incluyendo lipoproteínas, parecen ser uno de los más fuertes asociados al desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, hoy la investigación se enfoca fundamentalmente al estudio de la interacción gen-ambiente en la etiología y la patogénesis de la enfermedad, más que en el estudio individual de factores de riesgo (80; 81).

La ApoE se considera un biomarcador con alta plausibilidad biológica involucrado en el desarrollo de ECV, dado que es un componente importante de las lipoproteínas plasmáticas que regula el transporte de los lípidos y la homeostasis del colesterol en los sistemas cardiovascular y nervioso central (43; 72). Adicionalmente, incluye entre sus funciones el mantenimiento de la estructura de las partículas de lipoproteínas y la regulación del metabolismo de las mismas por medio de uniones de alta afinidad entre las lipoproteínas que las contienen y los receptores celulares; esta unión regula la captación y degradación de las lipoproteínas que llevan al metabolismo del colesterol y de los TAGs (43).

Varios estudios realizados en diferentes grupos étnicos han tenido como objetivo analizar la asociación existente entre polimorfismos de APOE, niveles circulantes de lípidos y riesgo cardiovascular. Aunque los resultados son altamente sugestivos sobre la asociación, coexisten varias fuentes de sesgo que limitan la credibilidad de los resultados reportados. Una de estas limitaciones son los estudios con tamaño de muestra muy reducida, menos de 1000 individuos, lo cual puede llevar, por falta de poder, a resultados espurios y por lo tanto contradictorios. Una manera de resolver este tipo de limitaciones es la integración de distintas fuentes de evidencia, por lo tanto, los meta-análisis se presentan como una alternativa interesante, que aporta resultados con un nivel de evidencia superior.

Un meta-análisis publicado en 2014 para población China, analizó 61 estudios relevantes que comprendían 6.634 pacientes/caso y 6.393 controles, encontrando que el alelo $\epsilon 4$ puede ser un factor de riesgo de enfermedad coronaria en la población china, sin embargo, el alelo $\epsilon 2$ no tiene ninguna asociación significativa en esta población (82). Un segundo meta-análisis publicado en el 2014 por Xu H. et al, incluyó 33 estudios de casos y controles, agrupando 18.752 casos de infarto agudo de miocardio (IM) y 18.963 controles. En este reporte, el análisis agrupado basado en todos los estudios incluidos mostró que los pacientes con IM tenían una disminución de la frecuencia del alelo $\epsilon 2$ (OR = 0,78, CI 95% = 0,70 a 0,87), y un aumento de la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ (OR = 1,15, 95% CI = 0,10 a 0,20), concluyendo que ser portador del alelo $\epsilon 4$ puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la IM y el portar del alelo $\epsilon 2$ es un factor protector en el desarrollo de IM (45).

Estos resultados parecen replicarse también para población asiática, según lo reportado por el meta-análisis realizado para esta población para la cual se encuentra que los portadores del alelo $\epsilon 4$ tenían 42% más de riesgo de enfermedad coronaria, mientras que el alelo $\epsilon 2$ no tenía ninguna asociación significativa con esta enfermedad (83).

Sin embargo, estos resultados no son totalmente reproducibles en población japonesa, en la cual encontraron que los individuos que portaban el alelo $\epsilon 2$ tenían una disminución significativa del riesgo para enfermedad coronaria, pero los portadores de $\epsilon 4$ no mostraron mayor riesgo (OR = 0,94; IC del 95%, 0,85 -1,03; p = 0,18), lo cual es incompatible con los informes anteriores (84).

Parece existir una tendencia, más no acuerdo, para todas las poblaciones, que el ser portador de $\epsilon 4$ es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de las cardiopatías coronarias, mientras que el alelo $\epsilon 2$ tiende a ser un factor de protección. La protección conferida por portar $\epsilon 2$, y el riesgo dado por $\epsilon 4$, pueden

ser explicados por la asociación existente entre $\epsilon 2$ y niveles más bajos de colesterol plasmático total, colesterol unido a LDL y ApoB; pero con niveles elevados de TAGs comparado con los portadores del alelo $\epsilon 3$. A diferencia del alelo $\epsilon 4$ el cual se asocia con niveles incrementados de CT, LDL, ApoB y TAGs (49; 69).

3.6 PRE-ECLAMPSIA

3.6.1 Pre-eclampsia, problema complejo de salud pública. La PE es un síndrome complejo, propio de la gestación humana, definido clínicamente con la presencia de hipertensión arterial de reciente inicio acompañado de proteinuria, hallazgos que se presentan posterior a semana 20 de gestación. Otras características de este síndrome incluyen convulsiones (eclampsia), anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y elevación de las transaminasas (síndrome HELLP: hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas), así como edema pulmonar e insuficiencia renal (85; 86).

La PE afecta a alrededor del 3-8% de todos los embarazos, lo cual conlleva a más de 50.000 muertes maternas por año en todo el mundo. Por otro lado, la PE es responsable de varias complicaciones neonatales que incluyen parto prematuro, restricción del crecimiento fetal, muerte perinatal y morbilidad cardiovascular a largo plazo asociado con el bajo peso al nacer (87; 88). Aunque se ha considerado la PE como una enfermedad aguda que desaparece con la terminación del embarazo, una vez se expulsa la placenta, existe evidencia que asocia el desarrollo de PE con ECV materna a largo plazo (18; 89), y con daño renal (90).

El diagnóstico actual de PE está determinado únicamente por la presión arterial ($\geq 140/90$) y la detección de proteinuria (≥ 300 mg/24h). Sin embargo, ni la

hipertensión ni la proteinuria son específicas de la fisiopatología de la PE, que se caracteriza por endoteliosis glomerular, una lesión histológica clásica (91). Como consecuencia de esto, mujeres con otras enfermedades, tales como, diabetes, obesidad o lupus, que se presentan con proteinuria e hipertensión durante el embarazo, a menudo son incorrectamente clasificados como PE (92; 93; 94; 95; 96).

Sumado a lo anterior, los criterios clínicos y de laboratorio actuales no permiten una evaluación precisa de la gravedad de la enfermedad ni del riesgo potencial para la madre y el feto (97; 98). Mientras que algunas mujeres con PE pueden ser manejadas de manera expectante hasta casi a término de la gestación, sin presentar complicaciones, otras pueden desarrollar complicaciones que amenazan su vida y la del feto (99; 100). Esta incapacidad para predecir con precisión los resultados adversos, aumenta considerablemente los costos en la atención médica de estas pacientes. En 1992, aproximadamente \$US20 millones se gastaron en los Estados Unidos para tratar a mujeres con diagnóstico de PE y sus recién nacidos (101).

3.6.2 Fisiopatología de la Pre-eclampsia. La PE se caracteriza por una falla muy temprana de la placentación durante la gestación. Esta alteración se presenta en dos etapas, la primera es un error poco conocido en el proceso de placentación normal, etapa en la cual la madre es asintomática. La segunda, es un trastorno materno multisistémico generalizado, que constituye la fase sintomática de la enfermedad (102). La placentación anormal produce una respuesta sistémica dada por un incremento en la resistencia vascular, activación del sistema de la coagulación, aumento de la agregación plaquetaria, disfunción endotelial y producción anormal de factores de crecimiento vascular (4; 18). Hallazgos similares, se encuentran en las ECV, como enfermedad coronaria y enfermedad cerebrovascular.

En el desarrollo de PE se han identificado varios factores de riesgo. Sin embargo, su evaluación, previa a la gestación, no es fácil, dado que son múltiples, y posiblemente el efecto no sea individual, sino debido a la interacción entre ellos. También, algunos son potencialmente modificables, por ejemplo el índice de masa corporal, mientras que otros, por ejemplo los factores genéticos y epigenéticos, no lo son.

Si bien, los factores de riesgo para el desarrollo de PE son múltiples, vale la pena mencionar los riesgos relativos (RR) para algunos factores, los cuales fueron bien resumidos en un estudio retrospectivo, publicado en el 2005. Algunos de los valores de RR (IC del 95%) fueron: 7,19 (5,85-8,83) para historia previa de PE, 9,72 (4,34-21,75) para anticuerpos antifosfolípidos preexistentes, 3,56 (2,54-4,99) para la diabetes preexistente, 2,93 (02.04 a 04.21) para un embarazo gemelar, 2,91 (1,28-6,61) para la nuliparidad, 3,60 (1,49-8,67) para antecedente de madre con PE, 2,12 (1,66-3,67) para el índice de masa corporal > 35 y 1,96 (1,34-2,87) para una edad materna > 40 años (103).

Existe aún controversia, si la PE hace parte de un espectro de severidad de la misma enfermedad, o si son patologías diferentes, que comparten vías fisiopatológicas. Sin embargo, se sigue utilizado para fines clínicos la clasificación de PE en leve, severa, eclampsia y síndrome de HELLP, con espectro de severidad, con las siguientes características distintivas:

- Pre-eclampsia Leve: Se caracteriza por presión arterial (PA) sistólica < a 160 mm Hg, diastólica < a 110 mm Hg y Proteinuria < 5 mg/dL. En ausencia de compromiso multiorgánico.

- Pre-eclampsia Severa: Si se presenta uno o más de estos criterios: i) PA sistólica \geq a 160 mmHg y/o PA diastólica \geq a 110 mmHg. ii) Proteinuria \geq 5

mg/dL/ orina de 24h o 3+ o más en 2 muestras. iii) Edema pulmonar o cianosis. iv) Dolor epigástrico. v) Restricción del crecimiento fetal (104).

- = Síndrome HELLP (Por sus siglas en inglés: *hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets count*): Se define como Síndrome HELLP completo cuando se cumplen los tres criterios; o incompleto, si solo se presenta uno o dos criterios: Hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y trombocitopenia. Los parámetros de referencia son: Aspartato aminotransferasas (AST) > 41, Alanina aminotrasnferasa (ALT) >50, bilirrubina total >1.2 mg/100mL, y recuento de plaquetas <150.000 mm (104).

- = Eclampsia: Cuando se presentan convulsiones, compromiso neurológico, hiperreflexia, dolor severo de cabeza persistentes o trastornos visuales (ceguera cortical, vasoespasmo retiniano), enfermedad cerebro vascular (105; 106) .

3.6.3 Impacto de la Pre-eclampsia sobre el riesgo cardiovascular. El embarazo es un estado natural que impone un estrés cardiovascular mayor y complicaciones comunes asociadas a este estado, tales como, hipertensión gestacional, PE y diabetes gestacional. Incluso un embarazo saludable desafía los límites de adaptación del organismo materno, especialmente impulsado por señales de la placenta, por ejemplo, hormonas y factores de crecimiento. El proceso normal de adaptación cardiovascular durante la gestación incluye expansión de volumen plasmático, vasodilatación periférica, aumento del gasto cardíaco, remodelación cardiaca y vascular y cambios en la hemodinámia (107; 108).

Muchos de los cambios en el corazón y vasos sanguíneos, ocurridos durante la gestación, regresan después del parto a los valores previos al embarazo. Sin embargo, estudios en animales han demostrado que la multiparidad conduce a

aumento de la rigidez vascular, en el tono venoso y a disfunción endotelial. Estos cambios pueden estar relacionados con formación de estrés oxidativo y disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) (109).

Complicaciones durante el embarazo, tales como hipertensión gestacional y PE, incrementa el riesgo cardiovascular futuro en las mujeres que padecen estas patologías. El estudio CHAMPS, (por sus siglas en inglés: *The Cardiovascular Health After Maternal Placental Syndromes*), demostró un incremento de 12 veces en el riesgo de ECV en mujeres que tuvieron un embarazo complicado con PE (110; 111). Además, la presencia de múltiples factores de riesgo tienen un efecto aditivo sobre el riesgo para las mujeres de desarrollar ECV que van desde 50% a 300%, por encima de la línea de base (112; 113; 114; 115).

La mortalidad por eventos cardiovasculares en mujeres con antecedentes de PE varía dependiendo de la severidad de la misma, tal como fue informado por Monfray- Chaddin et al, en un estudio prospectivo con seguimiento a largo plazo, 37 años, de mujeres con antecedente de PE. La razón de riesgo ajustada para muerte cardiovascular fue de 2,14, (IC 95% de 1,29 a 3,5), mientras que en mujeres con antecedente de PE severa, el índice de riesgo aumentó a 9,54 (CI 95% de 4,5 a 20,3), lo que subraya la importancia de la gravedad de la enfermedad (116).

No existe aún claridad si la PE es causa o consecuencia de ECV. La interpretación más sencilla es que los daños en el sistema cardiovascular materno son una consecuencia de la enfermedad, de modo que las complicaciones cardiovasculares de la PE no terminan necesariamente con el nacimiento del bebé y la expulsión de la placenta, aunque los síntomas agudos de la enfermedad se hayan resuelto en gran parte. Estudios recientes, han sido resumidos en un meta-análisis de 43 artículos, publicado en el 2013. Los autores concluyen que las mujeres con antecedentes de PE/eclampsia tenían el doble de probabilidades de

desarrollar o morir de enfermedades cardiovasculares en el futuro (OR de 2,28). El riesgo proyectado para la ECV fue ligeramente inferior (OR de 1,76), mientras que el riesgo relativo (RR) para el desarrollo de hipertensión arterial fue mayor (RR de 3.13). El antecedente de PE también se asoció con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal terminal (29).

A pesar de estas asociaciones bien establecidas entre las complicaciones del embarazo y riesgo cardiovascular futuro, la historia obstétrica no es un parámetro que se emplee actualmente en ninguna de las escalas para calcular el riesgo cardiovascular. Como resultado, la estratificación del riesgo de las mujeres jóvenes puede representar una subestimación de su riesgo real. Además de la historia obstétrica de la mujer como un indicador de riesgo cardiovascular, los biomarcadores séricos, tales como el perfil lipídico, pueden proporcionar información útil y ser herramienta adecuada para la estimación de riesgo cardiovascular futuro.

3.6.4 Pre-eclampsia y Lípidos. Los cambios en el metabolismo lipídico pueden contribuir a generar lesiones endoteliales que se observan en la PE, las cuales se relacionan con los niveles de hipertensión y proteinuria que reflejan la severidad de la enfermedad (117). Uno de los mecanismos que se ha postulado como desencadenante de PE, es el desarrollo anormal del metabolismo lipídico asociado a estrés oxidativo. Los niveles altos de TAGs parecen aumentar el riesgo de trastornos vasculares placentarios, que desencadena disfunción endotelial, aterosclerosis y trombosis, hallazgos característicos de la PE (118; 119).

El hallazgo de dislipidemia en pacientes con PE, caracterizada por altos niveles de TAGs y VLDL, puede indicar la presencia de aterosclerosis subclínica que estaría determinando eventos cardiovasculares adversos a una edad temprana (120). Los niveles de TAGs se pueden incrementar dos y tres veces más en mujeres con PE en comparación con mujeres normotensas (120; 121), aumento que podría ser

causado por niveles elevados del factor de necrosis tumoral (TNF- α), de interleucina-1 (IL-1) o por noradrenalina (69).

Los datos sobre los niveles de lipoproteínas y apolipoproteínas en PE son limitados y controversiales. Un estudio de casos y controles realizado en 35 mujeres con PE y 35 con embarazo normal en Turquía, reportó que los niveles de cHDL, Lipoproteína (a), ApoA1 y paraoxonasa 1 (PON1), eran significativamente bajos en las mujeres con PE en comparación con los controles ($p < 0.0001$); mientras que en los niveles de CT, TAGs, cLDL y ApoB no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El estudio concluye, a pesar del tamaño reducido de la muestra, que los lípidos, las lipoproteínas y sus productos oxidados, pueden jugar un rol importante en la patogénesis de la PE, pero es necesario realizar estudios a gran escala para aclarar su efecto (9).

Otro estudio realizado en ocho mujeres con PE y nueve mujeres con embarazos sin complicaciones (toma de muestra pre-parto y 24 a 48 horas post-parto con ayuno de 8-10 horas), arrojó que los TAGs y ácidos grasos libres se incrementaron en aproximadamente el doble en mujeres que desarrollaron PE en relación a los embarazos sin complicaciones ($p < 0,02$ y $0,004$, respectivamente); mientras que los niveles de CT, cHDL, cLDL no presentaron diferencias entre los grupos; las concentraciones de todos los lípidos disminuyeron significativamente en ambos grupos dentro de las 48 horas posteriores al parto. Sin embargo, los TAGs y concentraciones de ácidos grasos libres se mantuvieron más altos en mujeres con PE ($p < 0,006$, ambas variables) (121).

Atkinson et al, Realizaron un estudio de casos (PE=12) y controles (normotensas=12), con mujeres nulíparas de Australia y Nueva Zelanda, el estudio identificó diferencias de proteínas entre los dos grupos por medio de electroforesis en 2D. Las proteínas cuyas concentraciones fueron asociadas de forma selectiva con la PE incluyen la ApoE y la ApoC-II. Postulando que la producción alterada de

las isoformas de ApoE, podrían alterar el transporte inverso del colesterol, contribuyendo a daño arterial y al desarrollo de ECV a futuro (122). Como se ha mencionado las isoformas de la ApoE pueden contribuir a un incremento de los TAGs en mujeres con PE. La ApoE, aumenta durante el embarazo y esto puede favorecer la absorción de lípidos por los macrófagos (123).

Algunos estudios han realizado una aproximación a la correlación entre los niveles de apolipoproteínas y polimorfismos de APOE con el desarrollo de PE (15; 124; 125). Sin embargo, sus resultados han sido contradictorios y limitados debido al tamaño de muestra (entre 12 y 133 casos).

Al asociar el metabolismo anormal de los lípidos y los parámetros inflamatorios elevados acompañados de apoptosis se podría sugerir un papel potencialmente importante de la ApoE en la patología de la PE. La ApoE es un ligando esencial para la captación y el aclaramiento de las lipoproteínas aterogénicas; desempeña un papel importante en la aterosclerosis mediante la modificación de las respuestas inflamatorias y facilita el flujo de colesterol a partir de células espumosas. Hallazgos similares a los reportados en PE, para la cual se han documentado alteraciones en los niveles plasmáticos de los lípidos y profunda aterosclerosis aguda en el lecho placentario (126).

Estudios en modelos animales apoyan la fuerte asociación que existe entre PE y alteraciones en el metabolismo de los lípidos. En estudios realizados en ratones, se ha evidenciado asociación entre la ausencia del gen APOE con hiperlipidemia y aumento de marcadores inflamatorios (126). Mao L et al, realizaron un estudio en un total de 129 ratones entre WT y knockout para apoE y eNOS. Encontrando evidencia que en ratones apoE^{-/-} se presenta hiperlipidemia (niveles más altos de suero de TAGs, CT y LDL y menor nivel de HDL, $p < 0,05$), aumento de la reacción de inflamación (aumento de los niveles de IL-6, TNF- α y NF-kappa B) y apoptosis en placenta (niveles más altos de caspasa-3, Bax, una mayor relación de Bax /

Bcl-2 y la evidencia histológica), en comparación con el grupo WT. Síndromes similares a la PE, incluyendo PA elevada, aumento de proteínas en la orina y disminución del peso de la placenta. Este estudio sugiere que la posible patogénesis de PE es la inflamación causada por la dislipidemia y la disfunción de la eNOS podría contribuir a la exacerbación del cuadro clínico (126).

El potencial de la apoptosis en ratones apoE^{-/-} sugiere que el déficit de ApoE puede conducir a la apoptosis placentaria contribuyendo a la PE, como lo muestran las investigaciones de Reckless y Chen en estudios con hígados de ratones apoE^{-/-}. Por lo tanto, la dislipidemia de ApoE^{-/-} podría presentarse como una causa patógena en la respuesta inflamatoria y en la apoptosis. Además, la aterosclerosis se ve a menudo en ratones apoE^{-/-} (126; 127).

Diferentes líneas de evidencia indican que el metabolismo anormal de lípidos no es más que una manifestación de la PE, pero que participa de forma directa en su patogénesis. Sin embargo, no todas las mujeres con hiperlipidemia reaccionan automáticamente con aumentos en la presión arterial y proteinuria durante el embarazo. Por lo tanto, siguen existiendo inquietudes sin resolver que deben ser exploradas desde diversas miradas (126).

3.7 ESTUDIO GENPE: GENÉTICA & PRE-ECLAMPSIA

El Estudio GenPE, surge en el año 2000 como iniciativa de los Drs. Norma Serrano y Juan Pablo Casas. Corresponde a un estudio poblacional a gran escala para evaluar factores de riesgo, principalmente genéticos, asociados con el desarrollo de PE en población colombiana. (www.genpe.org) (128). Para el desarrollo del proyecto, se creó un consorcio nacional en el que participaron universidades colombianas, tales como: CES y la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB) de Medellín, Universidad de Cartagena, Universidad Industrial

de Santander (UIS) de Bucaramanga, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS) y Pontificia Javeriana en Bogotá, Universidad del Valle de Cali; bajo la coordinación de la Universidad Autónoma de Bucaramanga (UNAB) como institución líder. Este estudio, cuenta con la asesoría en epidemiología genética de investigadores de University College London (UCL) y de London School of Hygiene & Tropical Medicine (LSHTM), Reino Unido.

La captación de participantes para el estudio GenPE se hizo en el periodo comprendido entre enero de 2001 hasta mayo del 2012, logrando una muestra final de pacientes validadas de 3.702 casos (PE) y 4.705 controles (gestantes normotensas), de las cuales se tiene material biológico (MB) almacenado, asociado a datos clínicos. A partir del año 2008 también se incluyó la captación de MB del recién nacido, contando actualmente con información y MB de 1.119 casos y 1.738 controles. Esto con la finalidad de realizar estudios secundarios de impacto en el binomio madre-hijo (128).

3.7.1 Biobanco GenPE. De las participantes de GenPE que dieron su consentimiento por escrito para conservar sus muestras para estudios futuros relacionados con PE, su MB fue separado y almacenado en el Biobanco GenPE. Para esto se implementaron protocolos de manejo, se realizaron capacitaciones al personal y se establecieron análisis de trazabilidad; esto ha sido determinante para garantizar la optimización de los procesos y la calidad de las muestras usadas en estudios secundarios, como el actual.

Los registros, protocolos y procesos establecidos en el estudio, desde la captación de la paciente, pasando por toma de muestras, almacenamiento y el destino final de los datos y el MB, se encontraban disponibles en la página Web www.genpe.org para consulta permanente de los colaboradores del estudio (128).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen APOE, los niveles séricos de CT, cHDL, cLDL, TAGs, apolipoproteína E, y Preeclampsia, en mujeres colombianas captadas por el estudio GenPE.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los polimorfismos del gen de APOE rs429358 y rs7412.

Identificar la asociación entre los niveles séricos de CT, cHDL, cLDL, TAGs, apolipoproteína E, y el riesgo de desarrollar pre-eclampsia.

Estimar el efecto de los polimorfismos rs429358 y rs7412 y el fenotipo intermedio (CT, cHDL, cLDL, TAGs, apolipoproteína E), sobre el riesgo de desarrollar pre-eclampsia.

Evaluar el efecto de los niveles séricos de la ApoE, determinados por los polimorfismos y la presencia de PE.

5. ASPECTOS METODOLÓGICOS

5.1 DISEÑO

Estudio multicéntrico de casos y controles en mujeres gestantes de Colombia, anidado en el estudio GenPE (www.genpe.org).

5.2 UNIVERSO

Muestras biológicas de mujeres con PE (casos) y gestantes normotensas (controles), captadas por el estudio GenPE, entre enero de 2001 y febrero de 2011, en siete ciudades Colombianas (Bucaramanga, Bogotá, Cali, Medellín, Cúcuta, Tunja y Cartagena).

5.3 MUESTRA

Se incluyeron 2000 muestras del Biobanco del estudio GenPE (1000 casos y 1000 controles). Las muestras incluidas pertenecían a participantes que en el consentimiento informado, autorizaron el uso de sus muestras biológicas para estudios secundarios futuros relacionados con Pre-eclampsia.

El tamaño de muestra se calculó para estimar una asociación entre dos polimorfismos de APOE (rs429358 y rs7412), los niveles séricos de CT, cHDL, cLDL, TAGs, apolipoproteína E y PE, del orden de OR mayor o igual 1,5 bajo errores alfa de 0.05 y beta de 0.20, estimado para el alelo menor.

Tabla 2. Cálculo del tamaño de muestra para el estudio.

Error Alfa=0.05

Error Beta= 0.20

Relación: 1:1

		OR esperado					
		1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	2.0
Frecuencia de alelo menor	0.03	71899	18958	8861	5228	3502	1068
	0.05	42212	11120	5193	3061	2048	621
	0.10	19947	5241	2441	1435	957	286
	0.15	12525	3282	1524	893	594	174
	0.20	8814	2302	1065	622	412	119
	0.25	6588	1714	790	460	303	85
	0.30	5103	1322	607	351	230	63
	0.40	3248	832	377	216	140	35

Criterio de Inclusión del estudio GenPE. Pacientes con edad igual o menor a 25 años, que ingresaron a la institución hospitalaria por trabajo de parto o con diagnóstico de PE.

Casos: Los casos fueron designados siguiendo los criterios del *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy*:

Edad gestacional >20 semanas

Presión arterial Sistólica (PAS) 140 mm Hg o Presión Arterial Diastólica (PAD) 90 mm Hg o ambas.

Proteinuria 300 mgr/24 horas o 2 cruces (++) por tira reactiva, en una muestra de orina al azar sin evidencia de infección urinaria (2).

Controles: Primigestantes normotensas con embarazo a término (>37 semanas). Se asignó como control el parto que cumplió con los requisitos descritos y que se

presentó inmediatamente después del ingreso de un caso, en la misma institución de referencia.

Para la presente investigación, se incluyeron muestras de participantes del estudio GenPE que en su consentimiento informado habían autorizado que sus muestras biológicas fueran usadas para estudios posteriores relacionados con Pre-eclampsia y de las que se encontraba disponible sangre y suero.

Criterios de exclusión: Se excluyeron del estudio muestras almacenadas que no cumplieran con criterios de calidad (ver anexo 1 estándares de calidad).

Selección de muestras: A partir de la base de datos de GenPE se identificarán los códigos de las pacientes que autorizaron en su consentimiento informado el uso del material biológico para estudios relacionados con PE y que contaban con almacenamiento de sangre y de suero, sobre estos fueron seleccionados de forma aleatoria (muestreo sin reemplazo), 1000 casos y 1000 controles; posteriormente se generó un listado con los 2000 códigos continuos sin discriminar estado caso control.

5.4 MANEJO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL ACTUAL ESTUDIO

Las muestras se encontraban almacenadas en ultracongeladores a -80°C . Con base en el listado fueron extraídos 1 vial de sangre y 2 viales de suero de cada código del listado. Para garantizar la cadena de frío de las muestras, la búsqueda de los viales se realizó de la siguiente manera:

1. Identificación del código por duplicado

2. Exposición de las muestras fuera del ultracongelador por máximo 10 minutos a una temperatura ambiente de 20°C +/-2°C. Tiempo controlado por cronómetro.
3. Para los 10 minutos de exposición de las muestras fuera del ultracongelador, se crearon camas de hielo para ubicar las gradillas.
4. Las muestras seleccionadas fueron ubicadas en gradillas identificadas con número consecutivo y ubicadas en un módulo a -80°C hasta su análisis.
5. Transporte de muestras: Los sueros fueron transportados en hielo seco, para garantizar la cadena de frío hasta el análisis. El transporte de las muestras (de Bucaramanga a Bogotá –Laboratorio LabCare), se realizó siguiendo la normativa IATA para transporte de muestras biológicas categoría B (129).

5.5 ANÁLISIS BIOQUÍMICO: CUANTIFICACIÓN DE PERFIL LIPÍDICO Y APOLIPOPROTEÍNA E

Los análisis se realizaron a partir del suero almacenado en el Biobanco de GenPE. Todas las muestras fueron cuantificadas en la ciudad de Bogotá, en las instalaciones de LabCare de Colombia, en el equipo automatizado RxImola y con reactivos de la casa comercial Randox®. Los kits fueron seleccionados previa comparación con otros disponibles en el mercado, por un mejor costo y por la oportunidad de realizar el montaje de forma automatizada.

Antes de iniciar las pruebas, se realizó entrenamiento en el equipo RxImola para la cuantificación de los marcadores por técnica automatizada en LabCare de Colombia (ver anexo 2), empresa que también garantizó la disponibilidad del equipo y acompañamiento de un experto durante el proceso. Así mismo, se

realizaron pruebas de la estabilidad de los analitos y reproducibilidad de las técnicas (ver anexos 3, 4 y 5).

= Descripción del equipo Rx Imola.

El RX Imola es un analizador de química clínica totalmente automatizado de uso en laboratorios clínicos de alto y mediano rendimiento. Contiene unidades de enfriamiento que permiten el almacenamiento constante de reactivos, estación con cubetas de incubación y una pipeta de muestras con sensor de nivel de líquido, detección de bloqueo y de burbujas, alertas para muestras hemolizadas, ictericas o lipémicas/turbias. Cuenta con un software de basado en Windows®, que realiza generación automática de gráficos con los controles de calidad, valores medios y las estadísticas. Permite analizar ensayos colorimétrico, de punto final, cinética, bicromático, monocromático, turbidimétrico, muestra en blanco y procedimientos selectivos de iones por medio de detección de Absorbancia directa en cubeta (monocromática o bicromática) con 12 longitudes de onda (340, 380, 415, 450, 510, 546, 570, 600, 700,750, 800 nm).

= Descripción de las técnicas empleadas:

Se evaluaron los niveles de ApoE y las fracciones lipídicas, con el objetivo de correlacionar los niveles y establecer el efecto independiente de APOE en la presencia de enfermedad. Los analitos fueron cuantificados con las siguientes técnicas:

Tabla 3. Técnicas para la cuantificación de los analitos

Marcador	Técnica	Unidades	Sensibilidad	Rangos de detección	Valores de referencia
Colesterol Total	Colesterol oxidasa. Método enzimático de punto final (CHOD-PAP).	mg/dl	0	0 - 643	<200
Triglicéridos	Colorimétrico enzimático con lipasa. Método GPO-PAP	mg/dl	11.5	11.5 - 1133	<200
HDL	Método clarificante directo (HDL-C plus, 2da generación).	mg/dl	7.3	7.3 - 144	40 -60
LDL	Método clarificante directo.	mg/dl	7.3	7.30 - 860	100 – 159
APO E	Inmunoensayo - inmunoturbidimétrico.	mg/dl	1.04	1.04 - 12.3	2.7 - 4.5

Como control de calidad fueron seleccionados al azar el 10% de las muestras, para las cuales se realizó cuantificación por duplicado. Adicionalmente se usaron controles comerciales con concentraciones altas, medias y bajas de los analitos; estos montajes se realizaron entre los corridos de las muestras.

5.6 ANÁLISIS GENÉTICO

5.6.1 Extracción de ADN. A partir de una muestra de 1000ul de sangre periférica, se realizó extracción de con el kit DNA Blood Midi (QIAGEN, Germany),

al volumen de sangre establecido se le adicionó buffer de lisis, proteinasa K y se incubó a 70°C para realizar lisis celular y nuclear por medio físicos y químicos; posteriormente se agregó etanol y el lisado obtenido se pasó en su totalidad por medio de una columna de sílica gel usando centrifugación. Debido a la carga eléctrica de la membrana, el DNA es capturado. Posteriormente se realizaron lavados con buffer para eliminar los residuos celulares y de hemoglobina que pudieran ocasionar interferencia en la PCR. Una vez terminado este proceso se realizó la elusión, agregando un buffer que cambia la carga de la membrana para que el DNA sea liberado.

Al final de la extracción se obtuvo un volumen final de 250 ul de ADN para cada muestra; el volumen final se fraccionó en 4 viales según su uso:

Vial #1: 105 ul para la PCR

Vial#2: 105 ul archivo GenPE

Vial #3: 30 ul cuantificación de ADN

Vial #4: 10 ul para electroforesis.

La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit permite obtener ADN de alta calidad, con una concentración aproximada de 250 ng/ul.

5.6.2 Control de calidad del ADN. El control de calidad del ADN obtenido se realizó de forma cualitativa a partir de la fracción de 10 ul por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizadas en un transiluminador. Las muestras fueron catalogadas según la calidad de la banda observada. Las observaciones fueron registradas en el formato de electroforesis del Laboratorio de Genética Molecular de la UNAB. Para las muestras de DNA que no presentaban bandas, se realizó una segunda extracción a partir de un nuevo vial de sangre y partiendo de un mayor volumen. Posteriormente se realizó la electroforesis y se dejó como final la muestra que presentara mejor calidad en la electroforesis para cada código.

Para el control de calidad cuantitativo se envió la fracción de 30ul de ADN, a la Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI, Cambridge, Reino Unido) para análisis con el kit Quant-iT™ PicoGreen® (Invitrogen). Una vez se recibió la información de las concentraciones emitidas por la WTSI se realizó comparación de los resultados del control cualitativo y cuantitativo.

5.6.3 Genotipificación. Selección de SNPs (polimorfismo de Nucleótido Simple): Los polimorfismos rs429358 y rs7412 de la APOE, fueron seleccionados bajo los siguientes criterios:

- Polimorfismos ubicados en genes asociados con ECV.
- Polimorfismos localizados en regiones codificantes (cSNP), en intrones (región límite de inicio o terminación de un exón), región promotora o regiones reguladoras de la expresión (*enhancer, silencer*).
- Posibles implicaciones moleculares: cambios no sinónimos, alteraciones del sitio de splicing o regiones reguladoras de la expresión génica.
- Variantes que por cumplir los numeral 2 y/o 3 se asociaran con variación en los niveles de lípidos y de ApoE.
- Estado de validación: haber sido genotipificado por el proyecto HapMap (www.hapmap.org), o en su defecto tener reporte de frecuencias y datos de genotipo o haber sido sometido de manera múltiple e independiente para su validación.

Información complementaria de los polimorfismos seleccionados se encuentran en el anexo 6.

5.6.4 Método para genotipificación. La genotipificación se realizó por discriminación alélica, usando sondas de hibridación específica, que aplican la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET), utilizando un

termociclador de tiempo real LightCycler®480 (Roche®); éste equipo es un sistema de alto rendimiento de PCR en tiempo real, con plataforma flexible basado en la placa de PCR de 96 pozos que conduce a homogeneidad del pozo a pozo y maximiza la sensibilidad de detección.

Para la genotipificación del actual proyecto se usó el *Kit LightMix ApoE C112R R158C* (Roche®) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Como control de calidad el 10% de las muestras de DNA, escogidas al azar, fueron sometidas a una segunda genotipificación, usando la misma metodología. Todos los análisis de laboratorio se hicieron de manera enmascarada, sin conocer el estado caso-control de las muestras.

Nota: Información complementaria sobre la selección del método de genotipificación y la metodología usada se encuentran en el anexo 7.

5.7 CONTROL DE CALIDAD DE DATOS

5.7.1 Resultados de cuantificación. Los resultados fueron importados directamente del equipo RxImola, a la plataforma de la base de datos del estudio GenPE (a cargo del administrador de la base) y de manera simultánea se elaboró un archivo (Excel) con los resultados obtenidos. Posteriormente se realizó, un chequeo cruzado entre las dos bases con el fin de identificar posible errores en el empalme de los resultados y posible errores de digitación al ingreso de los códigos en el equipo.

5.7.2 Resultados de Genotipificación. Los resultados de las genotipificaciones obtenidas fueron analizados y digitados en un archivo de Excel. Luego se realizó un chequeo de la digitación por medio de una segunda lectura para el 100% de las

muestras. Para los casos en los que se encontró inconsistencias o dudas en el análisis los tutores del actual proyecto realizaron una segunda y tercer lectura que fue validada en la base final. Una vez se completaron los procesos de control de calidad las bases de datos se consideraron como archivos finales y se preservaron en medio magnético por duplicado. Las bases finales no fueron modificadas y los cambios necesarios para el análisis de datos se realizaron en copias de las mismas.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de las características sociodemográficas y clínicas de las participantes. Las variables cuantitativas se reportan como medianas y rango intercuantílico (*R/Q*), previa verificación de su distribución; las variables categóricas se reportan como frecuencias absolutas y relativas. Las diferencias entre los grupos (casos y controles) se analizaron mediante χ^2 y prueba no paramétrica de Mann Whitney para variables categóricas y continuas respectivamente.

Para los polimorfismos (rs429358 y rs7412), se determinaron las frecuencias alélicas, genóticas (caso y control) y el Equilibrio de Hardy-Weinberg mediante χ^2 en los controles. Así mismo, se determinaron las frecuencias de los genotipos épsilon ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 , en cada grupo.

Los niveles de cada uno de los marcadores evaluados fueron estudiados de forma continua y posteriormente se categorizaron en quintiles de acuerdo a la distribución de los niveles del analito en los controles, para establecer la forma de la asociación con el desenlace.

Para la evaluación de la asociación entre:

- Los genotipos epsilon y la presencia del desenlace, se realizó un modelo de regresión logística sin ajustar y ajustado por variables de confusión.
- Los genotipos epsilon y los niveles de los marcadores, se utilizó un modelo de regresión lineal verificando la normalidad de los residuales, ajustado por edad de las participantes.
- El fenotipo intermedio (niveles séricos de los lípidos y ApoE) y la presencia de PE, se realizó un análisis univariado para establecer factores de confusión y progresó a multivariado a través de regresión logística para obtener *Odds Ratio (OR)* e Intervalos de Confianza del 95% (IC95%) (siguiendo las recomendaciones Greenlan) (130).
- El fenotipo intermedio (niveles séricos de los lípidos y ApoE) y la severidad de la PE, se realizó un modelo de regresión logística multinomial sin ajustar y ajustado progresivamente por las variables de confusión.

Posteriormente se categorizaron los fenotipos de acuerdo a los límites reportados en la literatura para riesgo cardiovascular (CT >200 mg/dL, TAG >150 mg/dL, HDL <50 mg/dL, LDL/HDL >3, ApoE >5 mg/dl y relación CT/HDL), y los valores de referencia de los estuches empleados para la cuantificación; finalmente se realizó el análisis de asociación por quintiles y riesgo cardiovascular para presencia y severidad de la enfermedad, a través de regresión logística y regresión logística multinomial.

El análisis de las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas y la prueba metodológica de Hardy-Weinberg, se realizaron con Arlequín (*An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis*) 3.5.1.2. Los demás análisis se realizaron con Stata (*Data Analysis and Statistical Software*) 12.0.

6. RESULTADOS PARA LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

El actual proyecto se planteó para trabajar con una muestra de 1000 casos y 1000 controles, que permitiera disminuir la posibilidad, que tienen los estudios observacionales, de encontrar resultados falsos positivos por error tipo-I. El siguientes flujograma muestra el proceso de selección de las pacientes incluidas a partir de la población del Estudio GenPE (ver anexo 8).

6.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LAS PARTICIPANTES

La caracterización de la población estudiada se describe en las siguientes tablas:

Tabla 4. Características sociodemográficas de las participantes incluidas

Característica Sociodemográficas	Controles n= 843 (%)	Casos n= 987 (%)	<i>p</i>
Edad*	18 [17 - 20]	20 [17 - 23]	< 0,001
Lugar de Captación			
Cartagena	355 (42,1)	357 (36,2)	
Bucaramanga	207 (24,6)	179 (18,2)	
Medellín	160 (19,0)	303 (30,7)	
Cali	80 (9,5)	86 (8,7)	<0,001
Bogotá	20 (2,4)	31 (3,1)	
Tunja	10 (1,2)	19 (1,9)	
Cúcuta	9 (1,0)	8 (0,8)	
Popayán	2 (0,2)	4 (0,4)	
Etnicidad			
Mestiza	620 (74,8)	676 (69,0)	
Blanca	132 (15,9)	190 (19,4)	0,022
Afro-descendiente	73 (8,8)	101 (10,3)	
Indígena	4 (0,5)	13 (1,3)	
ESE** Bajo	740 (93,0)	855 (91,3)	0,188

*Mediana e RIQ, ** Estrato socioeconómico

Se evidencia una diferencia de edad entre casos y controles, esto se presenta porque las pacientes captadas con síndrome HELLP no tenían restricción de edad, ni de paridad, a diferencia de los controles y los casos con PE no HELLP que tenían como criterio de inclusión una edad menor o igual a 25 años y ser primigestantes. Por esta razón estas variables fueron consideradas en el análisis posterior como factores de confusión para hacer los ajustes requeridos.

Con relación al lugar de captación, el mayor porcentaje de pacientes del estudio provienen de Cartagena (42%), mostrando un mayor número de controles captados en esta región, comportamiento similar a Bucaramanga. A diferencia de Medellín, quien aportó más del 30% del total de casos incluidos. En cuanto a etnicidad la mayoría se auto-clasificó como mestiza (74,8%), y el 93% de la población analizada pertenece a estrato socioeconómico bajo. Con este análisis bivariado se identificaron tres variables de confusión: El centro de captación, la etnicidad y estrato socioeconómico, las cuales se tuvieron en cuenta para ajustar en los modelos multivariados.

Tabla 5. Características clínicas de las participantes incluidas

Característica Clínicas	Controles n (%)	Casos n (%)	<i>p</i>
Edad gestacional*	39 [38 - 40]	37 [35 - 39]	< 0,001
Primigestante	687 (100)	671 (86,3)	<0,001
Embarazo Múltiple	0	27 (2,7)	<0,001
Control prenatal	734 (939)	828 (92,6)	0,267
Madre con PE	64 (7,6)	147 (15,1)	<0,001
Hermana con PE	39 (4,7)	88 (9,0)	<0,001
Tabaquismo	14 (1,7)	16 (1,6)	0,952
Infecciones de vías urinarias	545 (64,7)	586 (59,7)	0,02
Infecciones de transmisión sexual	16 (1,9)	8 (0,8)	0,049
PAS media*	110 [105 - 115]	145 [140 - 155]	<0,001
PAD media*	686 [65 - 75]	95 [90 - 100]	<0,001
Epigastralgia	123 (14,7)	519 (53,2)	<0,001
Cefalea	87 (10,4)	699 (71,4)	<0,001
Hiperreflexia	3 (0,4)	219 (23,0)	<0,001
Convulsiones	0	13 (4,2)	0,006
Tinnitus	17 (2,4)	155 (19,0)	<0,001
Fosfenos	26 (3,2)	243 (25,5)	<0,001

*Mediana e RIQ, PAS: Presión Arterial Sistólica, PAD: Presión Arterial Diastólica.

Todos los controles fueron captados al término de la gestación (media de 39 semanas) y los casos al momento del diagnóstico de la PE (media de 37 semanas), esta variable también se tuvo en cuenta como confusora en los

modelos de análisis. Solo se presentó embarazo múltiple, en las mujeres con PE. El antecedente de madre o hermana con PE evidencia una diferencia estadísticamente significativa, coherente con el componente genético de la enfermedad. Es de aclarar que las infecciones descritas en la tabla, hacen parte de los antecedentes de la historia prenatal de las pacientes, no de su existencia al momento de la inclusión al estudio. Eventos clínicos como epigastralgia, cefalea, hiperreflexia, convulsión y fosfenos, hacen parte del cuadro clínico de la PE y las complicaciones asociada a la patología, y por ende su distribución diferencial.

Para dar respuesta a los objetivos planteados, a continuación se presentan los resultados:

6.1.1 Resultados.

Objetivo 1: Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los polimorfismos del gen de APOE rs429358 y rs7412.

Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de la población analizada

Polimorfismos	Controles n (%)	Casos n (%)	Valor de <i>p</i>
rs429358			
Alelos			
T	1499 (88,9)	1724 (87,3)	0,155
C	187 (11,1)	250 (12,7)	0,226
Genotipos			
TT	664 (78,7)	754 (76,4)	0,238
CT	171 (20,3)	216 (21,9)	
CC	8 (1,0)	17 (1,7)	
<i>Equilibrio HW*</i>			
<i>Ho</i>	0.20	0.21	
<i>He</i>	0.19	0.22	
<i>P</i>	0.48	0.77	
rs7412			
Alelos			
C	1566 (92,9)	1833 (92,9)	0,751
T	120 (7,1)	141 (7,1)	0,906
Genotipos			
CC	731 (86,7)	854 (86,5)	
CT	104 (12,3)	125 (12,7)	0,932
TT	8 (1,0)	8 (0,8)	
<i>Equilibrio HW*</i>			
<i>Ho</i>	0.12	0.12	
<i>He</i>	0.13	0.13	
<i>P</i>	0.06	0.14	

* Equilibrio de Hardy-Weinberg (alelos), valor *p*. *Ho*: Heterocigocidad observada, *He*: Heterocigocidad esperada.

Tabla 7. Frecuencias Haplotípicas en la población analizada

Haplotipos	Controles	Casos
	Cromosomas (%)	Cromosomas (%)
CC	187 (11)	250 (13)
TC	1379 (82)	1583 (80)
TT	120 (7)	141 (7)

Para las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los polimorfismo analizados no se observan diferencias entre casos y controles. Los casos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (rs429358 $p=0,48$ y rs7412 $p=0,063$).

A continuación se presenta el análisis de las frecuencias del genotipo epsilon ϵ (Ver tabla 8).

Tabla 8. Frecuencias de los genotipos epsilon

Genotipos epsilon	Controles n (%)	Casos n (%)	Valor de p
$\epsilon 2/\epsilon 2$	8 (1,0)	8 (0,8)	0,689
$\epsilon 3/\epsilon 3$	565 (67,0)	639 (64,8)	
$\epsilon 4/\epsilon 4$	8 (1,0)	17 (1,7)	
$\epsilon 2/\epsilon 3$	91 (10,8)	107 (10,8)	
$\epsilon 2/\epsilon 4$	13 (1,5)	18 (1,8)	
$\epsilon 3/\epsilon 4$	158 (18,7)	198 (20,1)	

El genotipo más frecuente fue el $\epsilon 3/\epsilon 3$ superando el 60% para ambos grupos, la distribución en general no difiere significativamente entre las pacientes con PE y gestantes normotensas.

Objetivo 2: Identificar la asociación entre los niveles séricos de CT, cHDL, cLDL, TAGs, apolipoproteína E, y el riesgo de desarrollar pre-eclampsia.

En la Tabla 9 se muestra que los niveles séricos para los biomarcadores analizados no poseen una distribución normal, por lo cual los análisis siguientes se realizaron mediante pruebas no paramétricas.

Tabla 9. Prueba de normalidad para las variables continuas, mediante Shapiro Wilk

Variable	n	W	V	z	Prob>z
Colesterol	1880	0,94936	56,773	10,251	0,000
HDL	1880	0,96753	36,399	9,123	0,000
LDL	1880	0,89634	116,205	12,069	0,000
LDL/HDL	1880	0,91233	98,285	11,644	0,000
Triglicéridos	1880	0,90136	110,58	11,943	0,000
Apo E	1880	0,94794	58,364	10,321	0,000

En la tabla 10, se presenta la distribución de los fenotipos intermedios para casos y controles en mediana y *RIQ*.

Tabla 10. Mediana y Rango Intercuartílico de los fenotipos intermedios controles vs casos

Fenotipo Intermedio (mg/dl)	Controles Mediana (RIQ)	Casos Mediana (RIQ)	Valor De <i>p</i>
Colesterol Total	197 [160,4 - 240,0]	185,4 [150,3 - 227,7]	0,0001
HDL	53,1 [43,4 - 64,1]	48,8 [38,4 - 60,8]	<0,001
LDL	114,6 [81,4 - 160,3]	103,8 [77,3 - 143,5]	<0,001
LDL/HDL*	2,16 [1,61 - 2,92]	2,21 [1,63 - 2,88]	0,9055
Triglicéridos	170,2 [134,8 - 220,8]	193,9 [151,8 - 257,1]	<0,001
Apo E	2,5 [1,7 - 3,4]	3,1 [2,1 - 4,1]	<0,001

*Relación LDL/HDL

Los fenotipos intermedios presentaron diferencias significativas, exceptuando la relación LDL/HDL.

Para analizar asociación de fenotipos intermedios con PE, estos se categorizaron según quintiles del grupo control y se modeló; ajustando primero por posibles factores confusores (modelo 1) y segundo por los demás niveles séricos (modelo 2).

Tabla 11. Distribución de los fenotipos intermedios por quintiles y su asociación con PE

Fenotipo/Quintiles (mg/dl)	Tipo de paciente n (%)		Fuerza de la asociación (OR e IC 95%)	
	Controles	Casos	Modelo crudo	Modelo 1
Colesterol				
<151,9	167 (19,8)	266 (25,6)	Referente	Referente
151,9 a 183,21	170 (20,1)	230 (22,2)	0,89 (0,64-1,12)	0,83 (0,55-1,25)
183,22 a 211,755	169 (20,1)	191 (18,4)	0,70 (0,53-0,946)	0,66 (0,44-1,00)
211,756 a 252,943	169 (20,1)	176 (17,0)	0,65 (0,49-0,87)	0,50 (0,32-0,76)
≥252,944	168 (19,9)	174 (16,8)	0,65 (0,48-0,87)	0,49 (0,32-0,77)
HDL				
<41,66	168 (19,9)	336 (32,4)	Referente	Referente
41,66 a 48,89	168 (19,9)	177 (17,1)	0,52 (0,39-0,69)	0,38 (0,25-0,59)
48,9 a 57,33	170 (20,2)	181 (17,4)	0,53 (0,40-0,70)	0,42 (0,27-0,64)
57,34 a 68,433	169 (20,1)	178 (17,2)	0,52 (0,39-0,69)	0,42 (0,28-0,64)
≥58,434	168 (19,9)	165 (15,9)	0,49 (0,36-0,65)	0,35 (0,23-0,55)
LDL				
<75,77	168 (19,9)	245 (23,6)	Referente	Referente
75,78 a 101,55	169 (20,1)	252 (24,3)	1,02 (0,77-1,34)	1,15 (0,75-1,77)
101,56 a 129,93	169 (20,1)	196 (18,9)	0,79 (0,59-1,05)	0,69 (0,44-1,06)
129,94 a 171,67	169 (20,0)	211 (20,4)	0,85 (0,64-1,13)	0,75 (0,49-1,16)
≥171,68	168 (19,9)	133 (12,8)	0,54 (0,40-0,73)	0,51 (0,32-0,82)
LDL/HDL				
<1,51	168 (19,9)	200 (19,3)	Referente	Referente
1,51 a 1,95	169 (20,1)	211 (20,4)	1,04 (0,78-1,39)	1,04 (0,68-1,57)
1,951 a 2,41	169 (20,1)	198 (19,1)	0,98 (0,73-1,31)	0,87 (0,58-1,32)
2,42 a 3,17	169 (20,0)	254 (24,5)	1,26 (0,95-1,67)	1,10 (0,73-1,65)
≥3,18	168 (19,9)	174 (16,7)	0,87 (0,64-1,16)	0,75 (0,49-1,16)
Triglicéridos				
<128,08	168 (19,9)	124 (12,0)	Referente	Referente
128,08 a 156,55	169 (20,1)	161 (15,5)	1,29 (0,94-1,77)	1,52 (0,97-2,39)
156,56 a 187,25	169 (20,1)	185 (17,8)	1,48 (1,08-2,02)	1,29 (0,83-2,00)
187,26 a 239,08	169 (20,0)	254 (24,5)	2,03 (1,50-2,75)	1,39 (0,89-2,17)
≥239,09	168 (19,9)	313 (30,2)	2,52 (1,87-3,40)	2,08 (0,89-2,17)
Apo E				
<1,51	166 (19,7)	142 (13,7)	Referente	Referente
1,51 a 2,15	171 (20,2)	132 (12,7)	0,90 (0,65-1,24)	0,70 (0,41-1,18)
2,16 a 2,7	169 (20,1)	173 (16,7)	1,19 (0,87-1,62)	1,40 (0,85-2,30)
2,8 a 3,6	169 (20,1)	225 (21,7)	1,55 (1,15-2,10)	1,40 (0,84-2,33)
≥3,7	168 (19,9)	365 (35,2)	2,53 (1,90-3,39)	2,13 (1,26-3,58)

Modelo 1: Ajustado por lugar de reclutamiento, antecedente étnico, nivel socioeconómico, edad materna, primigestacionalidad, embarazo múltiple, edad gestacional, presencia de infección o tabaquismo durante el embarazo y delta de tiempo entre el momento de toma de la muestra y su procesamiento definitivo.

El HDL se presenta con una tendencia como factor protector para la presencia de PE en la población a estudio, que se mantiene al ajustar por variables de confusión (Modelo 1). De manera contraria, los valores elevados de TGC (a partir del tercer quintil) muestran en el modelo crudo ser un factor de riesgo para PE, sin que se reproduzca esta tendencia con ninguno de los dos ajustes planteados. El único marcador cuya tendencia se mantiene después de los ajustes, es APOE, donde el quintil superior ($\geq 3,7$ mg/dl) se comporta como factor de riesgo para PE.

A continuación se presenta el análisis de quintiles por severidad de la enfermedad:

Tabla 12. Distribución de los fenotipos intermedios por quintiles y su asociación por severidad

Fenotipo/Quintiles	Tipo de paciente n (%)				Asociación según Modelo 1 (OR e IC 95%)					
	Controles	PE Leve	PE severa no HELLP	HELLP	PE Leve	PE Severa no HELLP	HELLP			
Colesterol										
<151,9	168 (19,9)	125 (25,5)	77 (29,6)	53 (22,8)	Referente	Referente	Referente			
151,9 a 183,21	171 (20,1)	109 (22,2)	54 (20,8)	57 (24,7)	0,82 (0,51 1,3)	0,77 (0,45 1,34)	1,04 (0,27 2,32)			(0,46)
183,22 a 211,755	169 (20,0)	102 (20,7)	40 (15,4)	42 (18,0)	0,74 (0,46 1,17)	0,55 (0,31 0,96)	0,63 (0,27 1,4)			
211,756 a 252,943	169 (20,0)	77 (15,7)	47 (18,1)	42 (18,0)	0,53 (0,33 0,87)	0,54 (0,30 0,97)	0,48 (0,13 1,13)			(0,20)
≥252,944	169 (20,0)	78 (15,9)	42 (16,1)	39 (16,7)	0,54 (0,32 0,88)	0,49 (0,27 0,89)	0,39 (0,17 0,91)			(0,17)
HDL										
<41,66	169 (20,0)	177 (36,1)	89 (34,2)	60 (25,8)	Referente	Referente	Referente			
41,66 a 48,89	169 (20,0)	79 (16,1)	54 (20,8)	35 (15,0)	0,41 (0,25 0,67)	0,40 (0,23 0,70)	0,23 (0,09 0,56)			(0,09)
48,9 a 57,33	170 (20,1)	86 (17,5)	42 (16,2)	45 (19,3)	0,47 (0,29 0,76)	0,34 (0,19 0,60)	0,49 (0,22 1,07)			(0,22)
57,34 a 68,433	170 (20,1)	75 (15,3)	38 (14,6)	53 (22,7)	0,46 (0,28 0,74)	0,35 (0,20 0,62)	0,40 (0,18 0,89)			(0,18)
≥58,434	168 (19,8)	74 (15,0)	37 (14,2)	40 (17,2)	0,41 (0,25 0,67)	0,34 (0,19 0,63)	0,16 (0,06 0,39)			(0,06)
LDL										
<75,77	169 (20,0)	127 (25,9)	60 (23,1)	45 (19,3)	Referente	Referente	Referente			
75,78 a 101,55	170 (20,0)	116 (23,6)	63 (24,2)	60 (25,7)	1,28 (0,78 2,11)	1,26 (0,71 2,23)	0,90 (0,39 2,10)			(0,39)
101,56 a 129,93	169 (20,0)	98 (20,0)	44 (16,9)	47 (20,2)	0,86 (0,52 1,41)	0,60 (0,33 1,11)	0,64 (0,27 1,50)			(0,27)
129,94 a 171,67	169 (20,0)	91 (18,5)	54 (20,8)	55 (23,6)	0,82 (0,50 1,35)	0,85 (0,47 1,52)	0,84 (0,38 1,87)			(0,38)
≥171,68	169 (20,0)	59 (12,0)	39 (15,0)	26 (11,2)	0,57 (0,33 0,99)	0,63 (0,33 1,20)	0,19 (0,06 0,54)			(0,06)
LDL/HDL										
<1,51	169 (20,0)	92 (18,8)	49 (18,9)	43 (18,4)	Referente	Referente	Referente			
1,51 a 1,95	170 (20,0)	105 (21,4)	41 (15,8)	54 (23,2)	1,19 (0,73 1,92)	0,89 (0,50 1,61)	2,01 (0,88 4,58)			(0,88)
1,951 a 2,41	169 (20,0)	94 (19,0)	48 (18,4)	48 (20,6)	1,07 (0,67 1,71)	0,78 (0,44 1,38)	1,23 (0,54 2,80)			(0,54)
2,42 a 3,17	169 (20,0)	108 (22,0)	74 (28,5)	59 (25,3)	1,19 (0,75 1,71)	1,23 (0,71 1,92)	1,55 (0,68 3,80)			(0,68)

Fenotipo/Quintiles	Tipo de paciente n (%)				Asociación según Modelo 1 (OR e IC 95%)								
	Controles	PE Leve	PE severa no HELLP	HELLP	PE Leve	PE Severa no HELLP	HELLP	HELLP	HELLP	HELLP			
≥3,18	169 (20,0)	92 (18,8)	48 (18,4)	29 (12,5)	1,90	2,12	3,53	0,86	(0,52	0,75	(0,41	0,70	(0,26
					1,41)	1,37)	1,83)						
Fenotipo/Quintiles	Tipo de paciente n (%)				Asociación según Modelo 1 (OR e IC 95%)								
	Controles	PE Leve	PE severa no HELLP	HELLP	PE Leve	PE Severa no HELLP	HELLP	HELLP	HELLP	HELLP			
Triglicéridos													
<128,08	168 (19,9)	67 (13,7)	40 (15,4)	17 (7,3)	Referente	Referente	Referente						
128,08 a 156,55	169 (20,1)	94 (19,1)	37 (14,2)	24 (10,3)	1,55	(0,93	1,25	(0,67	2,83	(0,76			
					2,59)	2,35)	10,49)						
156,56 a 187,25	170 (20,0)	92 (18,7)	46 (17,7)	35 (15,0)	1,21	(0,73	1,04	(0,57	3,28	(0,99			
					2,00)	1,92)	10,88)						
187,26 a 239,08	169 (20,0)	104 (21,2)	68 (26,2)	68 (29,2)	1,05	(0,62	1,58	(0,86	4,79	(1,51			
					1,78)	2,87)	15,17)						
≥239,09	170 (20,0)	134 (27,3)	69 (26,5)	89 (38,2)	2,11	(1,27	1,65	(0,89	5,40	(1,73			
					3,51)	3,05)	16,83)						
Apo E													
<1,51	169 (20,0)	107 (21,8)	26 (10,0)	9 (3,9)	Referente	Referente	Referente						
1,51 a 2,15	168 (19,9)	73 (14,9)	40 (15,4)	12 (5,1)	0,49	(0,27	1,20	(0,55	2,5)	7,34	(0,89		
					0,91)	60,12)							
2,16 a 2,7	170 (20,0)	95 (19,3)	43 (16,5)	26 (11,1)	1,19	(0,68	1,87	(0,89	8,6	(1,06			
					2,07)	3,92)	69,81)						
2,8 a 3,6	171 (20,1)	88 (17,9)	56 (21,5)	64 (27,5)	1,04	(0,59	2,13	(1,01	15,7	(2,08			
					1,83)	4,47)	119,05)						
≥3,7	169 (20,0)	128 (26,1)	95 (36,6)	122 (52,4)	1,5	(0,88	2,81)	3,71	(1,75	24,85	(3,29		
					7,85)	187,44)							

Regresión logística, Ajustado por modelo 1

Para realizar un análisis exploratorio en busca de la posible asociación estadística entre las fracciones lipídicas, lipoproteínas, ApoE, y el riesgo de PE, se utilizaron como puntos de corte, los valores de referencia de los estuches empleados para la cuantificación y los parámetros clínicos actuales para predicción de riesgo cardiovascular, tales como: i) CT >200 mg/dL, ii) TAGs >150 mg/dL, iii) HDL <50 mg/dL, iv) LDL/HDL >3, v), apoE >5 mg/dl y vi) relación CT/HDL, inicialmente para casos y controles (Tabla 11) y posteriormente por severidad (Tabla 14).

Tabla 13. Distribución de los indicadores de riesgo cardiovascular en las participantes y su asociación con PE

Fenotipo intermedio	Tipo de paciente n (%)		OR e IC 95%
	Controles	Casos	Ajustado
<i>Colesterol</i>			
<200	437 (51,8)	594 (60,2)	Referente
200 - 279	305 (36,2)	294 (29,8)	0,59 (0,44-0,79)
≥280	101 (12,0)	99 (10,0)	0,59 (0,37-0,92)
<i>HDL</i>			
<35	79 (9,4)	170 (17,2)	2,78 (1,66-4,68)
35 - 49	288 (34,1)	349 (35,4)	1,20 (0,90-1,61)
≥50	476 (56,5)	468 (47,4)	Referente
<i>LDL</i>			
<70	133 (15,8)	187 (19,0)	Referente
70 – 159	498 (59,1)	632 (64,0)	0,87 (0,56-1,34)
≥160	212 (25,1)	168 (17,0)	0,55 (0,33-0,91)
<i>Colesterol/HDL</i>			
<3.4	298 (35,4)	313 (31,7)	Referente
3,4 – 4,5	355 (42,1)	404 (40,9)	1,02 (0,76-1,37)
>4.5	190 (22,5)	270 (27,4)	1,20 (0,84-1,71)
<i>Triglicéridos</i>			
<150	296 (35,1)	237 (24,0)	Referente
150 - 199	268 (31,8)	288 (29,2)	0,99 (0,71-1,39)
≥200	279 (33,1)	462 (46,8)	1,41 (0,99-2,00)
<i>Apo E</i>			
<2.7	482 (57,2)	403 (40,8)	Referente
2.7 – 5	303 (35,9)	456 (46,2)	1,87 (1,38-2,54)
>5	58 (6,9)	128 (13,0)	2,31 (1,41-3,78)

Regresión logística, Ajustado por modelo 1

En este sub-análisis, se repite la relación evidenciada previamente, y los únicos marcadores que muestran su relación con la presencia de enfermedad son los niveles elevados de TAGs (>200 mg/dl) y de ApoE (>5mg/dl). Este comportamiento se mantiene al realizar el análisis según severidad, aunque en el caso de los TAGs solo para Síndrome de HELLP.

Tabla 14. Distribución por puntos de corte para riesgo cardiovascular en las participantes estudiadas y su asociación con severidad de la PE

Fenotipo (mg/dL)	Tipo de paciente n (%)				Asociación ajustada (OR e IC 95%)		
	Control	Preeclampsia leve	Preeclampsia severa no HELLP	HELLP	Preeclampsia leve	Preeclampsia severa no HELLP	HELLP
<i>Colesterol</i>							
<200	439 (51,9)	297 (60,5)	155 (59,6)	140 (60,1)	Referente	Referente	Referente
200 - 279	305 (36,1)	145 (29,5)	80 (30,8)	69 (29,6)	0,59 (0,42 0,82)	0,69 (0,46 1,03)	0,46 (0,25 0,82)
≥200	102 (12,0)	49 (10,0)	25 (9,6)	24 (10,3)	0,66 (0,40 1,08)	0,56 (0,30 1,06)	0,33 (0,14 0,78)
<i>HDL</i>							
<35	477 (56,4)	222 (45,2)	112 (43,1)	133 (57,1)	0,40 (0,22 0,72)	0,54 (0,27 1,09)	0,26 (0,10 0,70)
35 - 49	290 (34,3)	173 (35,2)	106 (40,8)	68 (29,2)	0,36 (0,21 0,64)	0,39 (0,19 0,77)	0,25 (0,09 0,63)
≥50	79 (9,3)	96 (19,6)	42 (16,1)	32 (13,7)	Referente	Referente	Referente
<i>LDL</i>							
<70	134 (15,8)	106 (21,6)	45 (17,3)	35 (15,0)	Referente	Referente	Referente
70 – 159	499 (59,0)	299 (60,9)	169 (65,0)	163 (70,0)	0,83 (0,52 1,35)	1,02 (0,57 1,82)	1,09 (0,46 2,57)
≥160	213 (25,2)	86 (17,5)	46 (17,7)	35 (15,0)	0,59 (0,34 1,02)	0,64 (0,32 1,27)	0,34 (0,12 0,96)
<i>Colesterol/HDL</i>							
<3,4	299 (35,3)	142 (28,9)	83 (31,9)	87 (37,3)	Referente	Referente	Referente
3,4 – 4,5	356 (42,1)	198 (40,3)	99 (38,1)	106 (45,5)	1,08 (0,77 1,50)	0,96 (0,64 1,44)	1,05 (0,59 1,85)
>4,5	191 (22,6)	151 (30,8)	78 (30)	40 (17,2)	1,28 (0,86 1,90)	1,14 (0,70 1,85)	0,88 (0,41 1,86)
<i>Triglicérido</i>							

s							
<150	296 (35,0)	131 (26,7)	72 (27,7)	34 (14,6)	Referente	Referente	Referente
150 - 199	269 (31,8)	155 (31,6)	69 (26,5)	63 (27,0)	1,00 (0,68 1,47)	0,80 (0,50 1,28)	2,94 (1,18 7,27)
≥200	281 (33,2)	205 (41,7)	119 (45,8)	136 (58,4)	1,37 (0,92 2,02)	1,29 (0,81 2,06)	3,8 (1,15 9,17)
<hr/>							
<i>Apo E</i>							
<2,7	483 (57,1)	260 (52,9)	100 (38,5)	42 (18,0)	Referente	Referente	Referente
2,7 – 5	304 (35,9)	186 (37,9)	121 (46,5)	148 (63,5)	1,62 (1,15 2,28)	2,09 (1,37 3,17)	3,22 (1,64 6,33)
>5	59 (7,0)	45 (9,2)	39 (15)	43 (18,5)	1,92 (1,11 3,32)	2,83 (1,48 5,40)	3,39 (1,37 8,38)

Regresión logística, Ajustado por modelo 1

Objetivo 3: Estimar el efecto de los polimorfismos rs429358 y rs7412 y el fenotipo intermedio (CT, cHDL, cLDL, TAGs, apolipoproteína E), sobre el riesgo de desarrollar pre-eclampsia.

Dando respuesta a este objetivo, en la tabla 13 se describen las frecuencias alélicas y genóticas de los polimorfismos (rs429358 y rs7412), así como los genotipos épsilon con la severidad de la PE. Posteriormente, se presenta un modelo para identificar la asociación genotipo – fenotipo intermedio (ver tabla 14), y finalmente se presentan modelos de asociación para cada genotipo épsilon (heterocigotos y homocigotos), con el fenotipo intermedio y la severidad de la enfermedad.

Como se puede evidenciar los genotipos epsilon $\epsilon 2/ \epsilon 2$, $\epsilon 4/ \epsilon 4$ y $\epsilon 2/ \epsilon 4$ son de muy baja frecuencia, encontrándose en menos del 1,5% tanto de casos como de controles; esto limita su análisis de correlación con el fenotipo intermedio, la presencia de enfermedad y su severidad. Sin embargo, sus resultados se presentan en las tablas 16, 18 y 17, respectivamente.

El alelo más frecuente fue $\epsilon 3$ y sus combinaciones posibles genotipos ($\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ y $\epsilon 3/\epsilon 2$), las cuales mostraron una distribución diferencial de dos fenotipos intermedios (TAGs y ApoE) en la población estudiada, con niveles más elevados entre pacientes con PE vs controles y según su grado de severidad (leve, severa y Síndrome de HELLP). Hallazgos que son estadísticamente significativos y se presentan en las tablas 15, 17 y 20, respectivamente.

Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismo (rs429358 y rs7412) con la severidad de la PE.

Fenotipo (mg/dL)	Control (46,3%)	846 Preeclampsia levemente	491 (26,8%)	Preeclampsia severa no HELLP 260 (14,2%)	HELLP233 (12,7%)	Valor de p
<u>Alelica</u>						
rs429358						
T	838 (99,1)	484 (98,6)		252 (96,9)	231 (99,1)	0,065
C	180 (21,2)	122 (24,8)		55 (21,2)	55 (23,6)	0,439
rs7412						
T	112 (13,2)	62 (12,6)		32 (13,1)	39 (15,9)	0,427
<u>Genotipos</u>						
rs429358						
TT	666 (78,7)	369 (75,2)		205 (78,8)	178 (76,4)	0,1
CT	172 (20,3)	115 (23,4)		47 (18,1)	53 (22,7)	
CC	8 (1,0)	7 (1,4)		8 (3,1)	2 (0,9)	
rs7412						
CC	734 (86,7)	429 (87,4)		228 (87,7)	194 (83,3)	0,779
TC	104 (12,3)	59 (12,0)		30 (11,5)	36 (15,4)	
TT	8 (1,0)	3 (0,6)		2 (0,8)	3 (1,3)	
<u>Variantes</u>						
<u>épsilon</u>						
ε2/ ε2	8 (1,0)	3 (0,6)		2 (0,8)	3 (1,3)	0,279
ε3/ ε3	567 (67,0)	313 (63,8)		177 (68,1)	147 (63,1)	
ε4/ ε4	8 (1,0)	7 (1,4)		8 (3,1)	2 (0,9)	
ε2/ε3	91 (10,7)	53 (10,8)		26 (10,0)	28 (12,0)	
ε2/ε4	13 (1,5)	6 (1,2)		4 (1,5)	8 (3,4)	
ε3/ε4	159 (18,8)	109 (22,2)		43 (16,5)	45 (19,3)	

Tabla 15. Modelo de asociación de los polimorfismo con el fenotipo intermedio.

Epsilon	Asociación Modelo*		
	PE Leve	PE Severa no HELLP	HELLP
ε2/ε2	1,11 (0,19 6,5)	1,44 (0,21 9,81)	2,74 (0,25 29,61)
ε4/ε4	0,67 (0,17 2,6)	1,16 (0,32 4,21)	2,59 (0,41 16,48)
ε2/ε3	0,79 (0,5 1,3)	0,67 (0,35 1,25)	1,25 (0,58 2,72)
ε2/ε4	0,83 (0,24 2,9)	1,10 (0,26 4,52)	4,27 (0,94 19,33)
ε3/ε4	1,13 (0,8 1,6)	0,96 (0,60 1,54)	1,15 (0,58 2,27)

Tabla 16. Modelo de asociación de los polimorfismo con el fenotipo intermedio.

Fenotipo Intermedio (mg/dl)	ε2/ε2	ε3/ε3	ε4/ε4	ε2/ε3	ε2/ε4	ε3/ε4	Valor de p
	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana	
	RIQ	RIQ	RIQ	RIQ	RIQ	RIQ	
Colesterol Total	188,2 [172,3 241,8]	190,3 [155,2 238,1]	170,2 [152,0 217,0]	189,5 [153,6 231,1]	191,8 [158,5 220,5]	190,8 [151,5 225,6]	0,5984
HDL	57,5 [50,6 64,5]	51 [41,1 62,6]	49 [41,9 57,4]	51,1 [42,2 61,7]	49,4 [42,1 61,8]	49,1 [39,1 64,0]	0,7883
LDL	120,4 [106,3 167,5]	110 [80,0 152,4]	105,4 [83,6 127,2]	106,5 [71,9 154,8]	118,4 [79,5 151,3]	103,2 [77,2 144,9]	0,3267
LDL/HDL	2,2 [1,8 2,9]	2,23 [1,63 2,90]	2,17 [1,70 2,74]	2,08 [1,60 - 2,92]	2,42 [1,62 2,79]	2,1 [1,59 2,76]	0,6529
Triglicéridos	178,9 [149,8 208,5]	181,1 [141,1 238,9]	159,5 [118,6 199,7]	191,4 [148,7 260,4]	184,9 [149,5 228,7]	185,1 [146,6 239,6]	0,3212
Apo E	3,6 [2,71 4,27]	2,8 [1,9 3,8]	2,1 [1,5 2,6]	2,8 [2,0 4,0]	2,8 [1,8 3,2]	2,6 [1,8 3,6]	0,0087

Tabla 17. $\epsilon 2/\epsilon 2$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.

Fenotipo Intermedio	Control	Preclampsia leve	Preeclampsia severa no HELLP	HELLP	Valor de p
(mg/dl)	Mediana [RIQ]	Mediana [RIQ]	Mediana [RIQ]	Mediana [RIQ]	
Colesterol Total	189,1 [184,8 241,8]	189,5 [94,1 227,1]	206,2 [121,8 290,6]	182,6 [176 300]	0,8911
HDL	57,5 [54,5 64,5]	55,6 [31,1 70]	40,5 [32,3 48,8]	62,1 [60,3 65,5]	0,3135
LDL	119,1 [106,3 151,9]	110,3 [38,2 167,5]	136,2 [78,6 193,8]	131,2 [110,2 212,2]	0,7591
LDL/HDL	2,23 [1,87 2,70]	1,57 [1,22 3,01]	3,2 [2,43 3,97]	2,17 [1,77 3,23]	0,3738
Triglicéridos	167,7 [142,9 204,8]	180,7 [104,7 199,5]	229,5 [155,3 303,8]	203,1 [153,5 442]	0,6772
Apo E	3,1 [2,56 3,88]	3,1 [2,7 4,1]	2,8 [1,27 4,4]	4,5 [4,2 5,3]	0,1767

Tabla 18. $\epsilon 3/\epsilon 3$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.

Fenotipo Intermedio	Control	Preclampsia leve	Preeclampsia severa no HELLP	HELLP	Valor de p
(mg/dl)	Mediana RIQ	Mediana RIQ	Mediana RIQ	Mediana RIQ	
Colesterol Total	197,1 [159,8 244,8]	188,6 [154,6 235]	190,5 [146 235]	179,9 [154,3 220,9]	0,0141
HDL	52,8 [42,8 63,4]	49,8 [38,5 60,1]	47,6 [39,5 60,4]	51,6 [39,1 62,8]	0,0034
LDL	114,9 [81,1 160,7]	104,9 [79,1 146,9]	111,9 [80,1 150,1]	100,5 [79,9 143,5]	0,1022
LDL/HDL	2,2 [1,62 3,04]	2,21 [1,65 2,88]	2,38 [1,74 2,98]	2,46 [1,72 3,47]	0,5452
Triglicéridos	170,4 [134,7 222,8]	186,2 [145,1 248,2]	190,5 [142 253]	215,3 [165,1 267,1]	0,0001
Apo E	2,5 [1,7 3,5]	2,6 [1,72 3,78]	3,1 [2,2 4,3]	3,7 [3,1 4,6]	0,0001

Tabla 19. $\epsilon 4/\epsilon 4$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.

Fenotipo Intermedio	Control	Preclampsia leve	Preeclampsia severa no HELLP	HELLP	Valor de <i>p</i>
(mg/dl)	Mediana [RIQ]	Mediana [RIQ]	Mediana [RIQ]	Mediana [RIQ]	
Colesterol Total	166,8 [151,1 198,6]	169,7 [126,2 238,6]	170,3 [156,4 229,7]	178,7 [155,5 201,8]	0,9609
HDL	48,9 [47,0 53,3]	50,1 [37,3 62]	45,8 [41,6 57,0]	52,9 [32 73,8]	0,9999
LDL	119,7 [90,4 144]	96 [69,7 134,2]	98,8 [84,8 134,6]	103 [87,7 118,3]	0,7037
LDL/HDL	2,53 [1,86 2,97]	2,16 [1,62 2,75]	2 [1,74 2,47]	2,17 [1,6 2,74]	0,8285
Triglicéridos	136,6 [113,8 166,5]	150,5 [102,7 168,3]	191,1 [136,1 268,6]	274,7 [199,7 349,7]	0,1186
Apo E	1,6 [1,3 2,2]	2 [1,0 2,2]	3,1 [2,4 3,7]	3,5 [3,0 4,0]	0,0093

Tabla 20. $\epsilon 2/\epsilon 3$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.

Fenotipo Intermedio	Control	Preclampsia leve	Preeclampsia severa no HELLP	HELLP	Valor de <i>p</i>
(mg/dl)	Mediana [RIQ]	Mediana [RIQ]	Mediana [RIQ]	Mediana [RIQ]	
Colesterol Total	201,1 [159,3 233,3]	172,7 [148,9 208,8]	189,2 [133,3 225,7]	185,2 [152,3 255,1]	0,3345
HDL	51,3 [45,3 65,3]	47 [38,6 56,7]	49,5 [37,6 57,9]	56,7 [46,8 63,9]	0,0096
LDL	114,4 [78,4 161,2]	101,1 [65,6 130]	98 [75,3 141,1]	114,9 [90,8 151,7]	0,2709
LDL/HDL	2,05 [1,57 2,78]	2,11 [1,58 2,96]	2,75 [1,80 3,69]	2,04 [1,69 2,71]	0,3926
Triglicéridos	164,5 [142,5 231,2]	194,5 [141,9 265,4]	215,4 [164,2 265,5]	231,9 [187,0 328,1]	0,0024
Apo E	2,7 [2,0 3,7]	2,6 [1,8 3,9]	3,9 [2,1 5,1]	3,8 [2,7 4,5]	0,0098

Tabla 21. $\epsilon 2/\epsilon 4$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.

Fenotipo Intermedio (mg/dl)	Control Mediana [RIQ]	Preclampsia leve Mediana [RIQ]	Preeclampsia		Valor de <i>p</i>
			severa HELLP Mediana [RIQ]	no HELLP Mediana [RIQ]	
Colesterol Total	194,1 [163,2 233,7]	177,1 [141,8 218]	165,1 [140 223,3]	205 [157,4 a 243,7]	0,9445
HDL	54,9 [42,9 68,4]	42,7 [35,0 56,7]	44,2 [36,4 61]	55 [42,3 66]	0,518
LDL	111,6 [82,8 157,6]	93,9 [72,1 120]	88 [70,1 138,6]	111,8 [83,2 151,1]	0,6125
LDL/HDL	2,08 [1,57 2,81]	2,08 [1,62 2,70]	2,24 [1,57 2,76]	2,12 [1,65 2,62]	0,5237
Triglicéridos	175,2 [131,1 224,5]	184,6 [150,1 236,4]	185,1 [139,5 235,4]	225,5 [168,6 285]	0,0955
Apo E	2,5 [1,6 3,3]	2,4 [1,5 3,4]	3 [2,1 3,8]	3,8 [3,1 4,8]	0,0632

Tabla 22. $\epsilon 3/\epsilon 4$, fenotipo intermedio y severidad de la PE.

Fenotipo Intermedio (mg/dl)	Control Mediana [RIQ]	Preclampsia leve Mediana [RIQ]	Preeclampsia		Valor de <i>p</i>
			severa no HELLP Mediana [RIQ]	HELLP Mediana [RIQ]	
Colesterol Total	200,6 [158,5 220,5]	190,6 [166 290,9]	184,3 [128,9 204,1]	199,1 [161,2 216,1]	0,0073
HDL	49,3 [43,0 60,3]	45,7 [37,0 82,0]	43,8 [37,4 50,8]	54,9 [49,7 62,9]	0,0001
LDL	110,7 [80,3 151,3]	138,5 [80,8 228,8]	102,6 [53,4 141,4]	114,4 [69,5 126,4]	0,0009
LDL/HDL	2,42 [1,62 2,62]	2,86 [1,92 3,19]	2,32 [1,35 2,77]	2,11 [1,52 2,62]	0,9601
Triglicéridos	156,3 [137,5 188,6]	174,6 [150,6 210,2]	177,2 [117,9 208,5]	237,5 [179,8 301,2]	0,0012
Apo E	2,3 [1,8 3,0]	2,7 [2,4 4,4]	1,8 [0,8 2,8]	3,5 [2,86 4,9]	0,0001

Tabla 23. Asociación entre las variantes épsilon con los fenotipos intermedios y severidad de la PE.

Epsilon / Fenotipo	Asociación Modelo*			
	Control	PE Leve	PE Severa no HELLP	HELLP
Colesterol				
ε2/ε2	2,7 (-44,6 50,1)	-28,4 (-99,8 42,9)	16,3 (-72,54 105,1)	26,0 (-44,8 96,8)
ε4/ε4	-33,3 (-80,7 14,0)	-18,9 (-65,9 28,1)	-7,1 (-52,3 38,0)	-21,2 (-108,0 65,5)
ε2/ε3	-2,2 (-17,2 12,8)	-9,1 (-27,4 9,1)	-2,5 (-28,7 23,7)	3,9 (-21,2 28,9)
ε2/ε4	-8,7 (-46,1 28,6)	25,6 (-25,1 76,3)	-29,1 (-92,2 34,0)	-5,4 (-49,5 38,6)
ε3/ε4	-2,6 (-14,5 9,3)	-16,9 (-30,6 -3,3)	-9,5 (-30,7 11,7)	9,9 (-10,8 30,6)
HDL				
ε2/ε2	1,4 (-11,6 14,4)	1,6 (-18,8 22,0)	9,8 (-34,4 14,8)	9,7 (-10,1 29,5)
ε4/ε4	-5,2 (-18,2 7,8)	-2,6 (-16,1 10,8)	0,3 (-12,2 12,8)	-0,6 (-24,9 23,6)
ε2/ε3	1,4 (-2,6 5,6)	-2,7 (-7,9 2,6)	-4,3 (-11,6 2,9)	1,6 (-5,4 8,6)
ε2/ε4	-1,5 (-11,8 8,7)	3,6 (-10,9 18,1)	-6,2 (-23,8 11,2)	-0,14 (-12,5 12,2)
ε3/ε4	2,6 (-0,6 5,9)	-4,7 (8,7 -0,8)	-1,0 (-6,9 4,8)	1,9 (-3,9 7,7)
LDL				
ε2/ε2	1,7 (-45,2 48,7)	-12,0 (-72,7 48,7)	20,7 (-51,1 92,6)	35,6 (-22,7 93,9)
ε4/ε4	-9,4 (-56,3 37,4)	-18,5 (-58,5 21,5)	-11,8 (-48,4 24,7)	-17,2 (-88,6 54,2)
ε2/ε3	-0,7 (-15,6 14,2)	-2,2 (-17,8 13,3)	-3,4 (-24,6 17,8)	4,4 (-16,2 25,0)
ε2/ε4	-7,4 (-44,4 29,6)	34,9 (-8,3 78,1)	-22,6 (-73,7 28,4)	-14,0 (-50,3 22,2)
ε3/ε4	-15,6 (-27,2 -3,9)	-15,6 (-27,2 -3,9)	-17,0 (-34,2 0,1)	6,6 (-10,4 23,7)
Triglicéridos				
ε2/ε2	-2,5 (-57,8 52,6)	-46,2 (-147,5 54,9)	25,0 (-90,8 140,8)	40,6 (-62,6 143,9)
ε4/ε4	-48,5 (-103,66 6,7)	-53,3 (-120,0 13,4)	2,1 (-56,7 61,1)	45,4 (-81,2 172,0)
ε2/ε3	-0,29 (-17,8 17,2)	0,4 (-25,5 26,3)	13,7 (-20,5 47,9)	29,1 (-7,4 65,6)
ε2/ε4	-19,5 (-63,0 24,0)	34,8 (-37,1 106,7)	-43,5 (-125,8 38,8)	16,4 (-47,9 80,7)
ε3/ε4	-1,4 (-15,3 12,5)	-12,3 (-31,7 7,1)	2,5 (-125,8 38,8)	11,0 (-19,2 41,1)
Apo E				
ε2/ε2	0,57 (-0,3 1,5)	0,4 (-1,4 2,2)	-0,5 (-2,7 1,6)	0,8 (-0,9 2,6)
ε4/ε4	-1,0 (-1,9 -0,1)	-1,3 (-2,4 -0,7)	-0,3 (-1,4 0,8)	-0,5 (-2,6 1,7)
ε2/ε3	0,1 (-0,2 0,4)	0,2 (-0,2 0,7)	0,3 (-0,3 0,9)	-0,03 (-0,7 0,6)
ε2/ε4	-0,2 (-0,9 0,5)	0,5 (-0,7 1,8)	-1,5 (-3,1 -0,02)	-0,1 (-1,1 1,0)
ε3/ε4	-0,1 (-0,4 0,1)	-0,3 (-0,6 0,1)	-0,2 (-0,7 0,3)	0,1 (-0,03 0,1)

Regresión lineal ajustada por edad de la participante

Objetivo 4: Evaluar el efecto de los niveles séricos de la ApoE, determinados por los polimorfismos y la presencia de PE.

A continuación se describe el comportamiento de la ApoE según los genotipos épsilon y la severidad de la enfermedad.

Tabla 24. Modelos de asociación de ApoE con los genotipos épsilon y la PE

Genotipo/ Fenotipo Intermedio (mg/dl)	Control Mediana (RIQ)	PE Leve Mediana (RIQ)	PE severa no HELLP Mediana (RIQ)	HELLP Mediana (RIQ)	Valor de p
$\epsilon 2/\epsilon 2$	3,1 [2,56 a 3,88]	3,1 [2,7 a 4,1]	2,8 [1,27 a 4,4]	4,5 [4,2 a 5,3]	0,1767
$\epsilon 3/\epsilon 3$	2,5 [1,7 a 3,5]	2,6 [1,72 a 3,78]	3,1 [2,2 a 4,3]	3,7 [3,1 a 4,6]	0,0001
$\epsilon 4/\epsilon 4$	1,6 [1,3 a 2,2]	2 [1,0 a 2,2]	3,1 [2,4 a 3,7]	3,5 [3,0 a 4,0]	0,0093
$\epsilon 2/\epsilon 3$	2,7 [2,0 a 3,7]	2,6 [1,8 a 3,9]	3,9 [2,1 a 5,1]	3,8 [2,7 a 4,5]	0,0098
$\epsilon 2/\epsilon 4$	2,5 [1,6 a 3,3]	2,4 [1,5 a 3,4]	3 [2,1 a 3,8]	3,8 [3,1 a 4,8]	0,0098
$\epsilon 3/\epsilon 4$	2,3 [1,8 a 3,0]	2,7 [2,4 a 4,4]	1,8 [0,8 a 2,8]	3,5 [2,86 a 4,9]	0,0001

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La Pre-eclampsia, considerada como una enfermedad compleja, en donde los factores ambientales podrían actuar como activadores de una susceptibilidad genética individual, genera el interés en realizar un abordaje desde la perspectiva genética para evaluar la contribución de los SNPs (rs429358, rs7412), sobre el fenotipo intermedio (CT, cHDL, cLDL, TAGs, ApoE), en relación con la presencia de PE y su severidad.

Para evaluar esta posible asociación, en el actual estudio se incluyeron 843 controles y 987 casos. Como se mencionó previamente, en la descripción de las características sociodemográficas de la población, se resalta la diferencia en el lugar de captación de las participantes (ver tabla 1), variación que puede deberse al número de partos/año de cada centro, a la efectividad del personal del estudio GenPE para incorporar participantes, o por el año de apertura de la ciudad. En cuanto a las características clínicas se encuentran diferencias significativas en las presiones arteriales diastólica y sistólica, que confirman lo esperado según los criterios de inclusión establecidos por el estudio para esta variable. Así mismo, la epigastralgia, cefalea, hiperreflexia, convulsión y fosfenos, signos y síntomas que son inherentes a las características clínicas de la PE (ver tabla 2).

Nuestros resultados apoyan el concepto de Pre-eclampsia como enfermedad multifactorial en la cual factores genéticos interactúan de manera compleja con factores medio ambientales, y dan como resultado una patología con diferentes espectros de presentación, que van desde PE leve hasta síndrome de HELLP. La predisposición genética a desarrollar PE, se valida con nuestros resultados, encontrando que el antecedente de madre o hermana con PE se duplica en los casos comparado con los controles (15% vs 7,6% respectivamente). Hallazgo que confirma el componente genético de la enfermedad, para la cual se ha definido

una heredabilidad del 54% (131), con una contribución genética de la madre del 35%, fetal del 20%, y compartida por la pareja del 13%. El 33% restante es aportado por el medio ambiente (132). Este hallazgo de agregación familiar, reportados por otros autores (133), ha sido reproducido consistentemente por el estudio GenPE en análisis realizados en diferentes momentos (134; 135).

Para abordar la asociación genética, es importante resaltar que los dos SNPs se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias alélicas en los controles para el rs429358 fueron de T=88,9% y C=11,1% y la genotípica de TT=78,7% CT=20,3% y CC=1,0%; para el rs7412 la frecuencia alélica es de C=92,9% y T=7,1% y las genotípicas de CC=86,7% CT=12,3% y TT=1,0% (ver tabla 3). Frecuencias similares a las reportadas en el proyecto HapMap para población Yoruba y Mexicana en los dos SNPs; a diferencia de la población caucásica en donde los dos polimorfismos, tienen frecuencia del 50% para cada alelo (ver anexo 6). En conclusión para el presente estudio, no se observaron diferencias significativas entre casos y controles para los polimorfismos analizados (rs429358, rs7412).

La importancia clínica asociada a los polimorfismos previamente descritos, está en la generación de los genotipos denominados épsilon, que codifican las diferentes isoformas de la ApoE, factor determinante en el transporte y metabolismo del colesterol y estabilidad estructural de las lipoproteínas (136); por esta razón han sido estudiados como factor de riesgo para ECV y neurodegenerativas; encontrando que su frecuencias alélicas varían según la población estudiada (137). La muestra analizada en este proyecto, que incluyó 1830 mujeres colombianas captadas en 8 ciudades el país, y representa la mayoría de grupos étnicos del país, encontró las siguientes frecuencias alélicas: $\epsilon 3/\epsilon 3$ (67%), $\epsilon 3/\epsilon 4$ (18,7%), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (10,8%), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (1,5%), $\epsilon 2/\epsilon 2$ (1%) y $\epsilon 4/\epsilon 4$ (1%); no se observaron diferencias entre casos y controles (ver tabla 5).

Aunque hasta el momento no contamos con frecuencias genotípicas para la población Colombia en el proyecto HapMap, sí se han publicado un par de estudios, con tamaños de muestras pequeños, en los cuales se reportan frecuencias alélicas para población colombiana. Los resultados para el estudio realizado en población de Quindío (138), coincide con los nuestros, en que el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ es el más frecuente en la población. Este trabajo, posiblemente por el tamaño limitado de la muestra no reportó individuos con el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$, el cual si fue encontrado en nuestro estudio, con un porcentaje bajo. Situación similar se encuentra con otro estudio realizado en 200 individuos de Bogotá, en el cual el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ fue el más frecuente y los genotipos $\epsilon 2/\epsilon 2$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$, no fueron encontrados (74). Un artículo, recientemente publicado, en población “paisa”, describe todos los genotipos posibles, y los resultados coinciden con los nuestros en encontrar la frecuencia más alta para el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ (66.33%) y la más baja $\epsilon 4/\epsilon 4$ (1,89%) (66).

Estos resultados confirman la necesidad de estructurar proyectos con tamaños de muestras adecuados y robustos, cuando se analizan polimorfismos genéticos asociados a enfermedades, para el caso del gen APOE, los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$, con baja frecuencias, son precisamente los que se han asociado como alelos de protección o susceptibilidad para varias enfermedades incluyendo dislipidemia, aterosclerosis, enfermedad coronaria y EA.

En cuanto a la descripción de los genotipos asociados a PE, en nuestro estudio no se observaron diferencias significativas entre casos y controles. Esto es similar a lo descrito por Makkonen et, al un estudio realizado en Finlandia que incluyó 133 mujeres con PE y 91 controles, los autores concluyen que el polimorfismo de APOE no juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (125). A diferencia de uno realizado por Procopciuc et al, en Rumania, en 51 mujeres con PE y 50 con embarazos normales, en donde concluyeron que $\epsilon 4$ representa un factor de riesgo para la dislipidemia e influye en el resultado perinatal de la PE

(139). En la misma vía, un estudio reportado en población Iraní encontró que $\epsilon 2$ puede desempeñar un papel protector asociado a la PE (140).

Al analizar los niveles séricos las lipoproteínas y ApoE, de los resultados obtenidos, se demuestra una asociación entre dislipidemia materna durante el embarazo, caracterizada por hipertrigliceridemia y niveles incrementados de ApoE, y el riesgo de pre-eclampsia. Las pacientes con PE tienen un incremento en los niveles de TAGs de 23 mg/dl ($p < 0.001$) con respecto a los controles. Niveles séricos por encima de 239 mg/dl se presentan como un factor de riesgo independiente asociado con PE en la población gestante colombiana estudiada, con un OR=2,52 (IC 95% 1,87-3,40). Sin embargo, al realizar el análisis estratificada (categorizado por puntos de corte para riesgo cardiovascular), por la clasificación clínica de PE, en leve, severa y síndrome de HELLP, esta asociación solo se mantiene, con síndrome de HELLP, con OR=3,8 (IC 95% 1,15- 9,17). Es posible que la pérdida de asociación con PE leve y severa este dado por falta de poder, pues el tamaño de la muestra está calculado para PE en general y no para los subtipos clínicos de severidad. Por otro lado, si bien en nuestro estudio, como la mayoría de los estudios publicados, las muestras sanguíneas se obtuvieron en el tercer trimestre del embarazo, hay estudios en los cuales se cuantificaron TAGs antes de semana 20 de gestación, encontrando que gestantes con niveles incrementados desarrollaban con mayor frecuencia PE. Lo anterior, sugiere que este analito, junto a otros, podría ser un candidato como biomarcador de pronóstico para el desarrollo de PE, para ser medido en el primer trimestre de la gestación, antes de presentarse los hallazgos clínicos que determinan el diagnóstico de la enfermedad (HTA + proteinuria) (141; 142).

Estos resultados están acorde con los publicados previamente; postulando que la hipertrigliceridemia puede hacer parte de la etiopatogenia PE y considerarse como predictor del riesgo de PE, en este sentido, aunque los TAGs pueden estar elevados en las gestaciones normales, un incremento excesivo puede conducir a

un entorno oxidativo con lesión endotelial y desarrollo consiguiente de PE (27; 117).

La asociación con TAGs y PE es concordante con lo reportado en población Africana (125), en donde los niveles de TAGs se incrementaron dos y tres veces más en mujeres con PE en comparación con mujeres normotensas; esto puede indicar la presencia de aterosclerosis subclínica que estaría determinando eventos cardiovasculares adversos a una edad temprana (36; 143). En otro estudio realizado en Francia por Francoual et al. reportaron la proporción de TAG y ApoE significativamente mayor en PE leve, pero no con PE severa; sin embargo, concluyeron que la ApoE y los niveles de NO pueden estar implicados en la PE (144).

Debido a lo anterior, se podrían generar nuevos estudios de cohorte que permitan identificar el efecto causal de la ApoE y los TAGs en la PE. Así mismo, identificar valores de referencia por trimestre de gestación para la población colombiana, lo que permitiría generar a futuro intervenciones de prevención y promoción en las gestantes de nuestro país.

Con referencia a los niveles de HDL, en la población estudiada se encontró una disminución de 13 mg/dl ($p < 0.001$) en las pacientes con PE comparadas con los controles, con una $p = < 0,001$. La mayor parte de los estudios señalan una tendencia a presentar niveles bajos en PE, pero sin alcanzar niveles de significancia. En un estudio con gestantes colombianas se describió una *odds ratio* de 2,42 para el riesgo de PE en aquellas gestantes con cHDL $< 1,24$ mmol/l previo al parto (IC 95%: 1,53-3,84) (145). No encontramos diferencias significativas entre las pacientes con PE y las gestantes normotensas con respecto a los niveles de CT, LDL, LDL/HDL.

Nosotros detectamos una correlación significativamente positiva entre los niveles elevados de ApoE y PE; niveles séricos de 3,1 mg/dl para los casos vs. 2,5 mg/dl para los controles, $p < 0,001$. Avanzando en el análisis y posterior a ajustar por posibles confusores, niveles ≥ 5 mg/dl de ApoE se asocia de manera independiente con PE con OR=2,31 (IC 95% de 1,41-3,78). Asociación que se mantiene al hacer el análisis estratificado por los tipos clínicos de PE, mostrando un claro gradiente entre la severidad de la PE y la fuerza de la asociación: PE leve: OR=1,92 (IC 95% 1,11-3,32), PE severa: OR=2,83 (IC 95% 1,48-5,40), síndrome de HELLP: OR=3,39 (IC 95% 1,37-8,38).

Estas alteraciones en el metabolismo lipoprotéico también han sido descritas como factores de riesgo cardiovascular (89). Esta asociación sugiere que la ECV y la PE compartirían mecanismos fisiopatológicos comunes y podrían explicar, en parte, el riesgo incrementado a eventos cardiovasculares oclusivos y no oclusivos que tienen las mujeres con antecedente de PE en su vida futura (146).

Una revisión sistemática y meta-análisis que incluyó 25 estudios prospectivos con 3.488.160 mujeres en total, 198.952 de ellas con PE, determinó que el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares en mujeres con el antecedente de PE es para hipertensión arterial de 3,70 (2,70-5,05), para cardiopatía isquémica de 2,16 (1,86 - 2,52), para accidente cerebrovascular de 1,81 (1,45 - 2,27) y de 1,79 (1,37 - 2,33) para tromboembolismo venoso (18). El embarazo por lo tanto se ha postulado como una prueba de esfuerzo que estratifica el riesgo para la ECV a futuro (147). Pero, también puede ser visto como una prueba de esfuerzo que revela fenotipos cardiovasculares subclínicos existentes, antes de evidenciar la enfermedad (89).

Así mismo, se ha descrito que las isoformas de la ApoE pueden contribuir a un incremento de los TAGs en mujeres con PE. La ApoE, de manera fisiológica aumenta durante el embarazo y esto puede favorecer la absorción de lípidos por

los macrófagos. Pero un incremento excesivo de ApoE, probablemente interfiera con la lipólisis y por ende en incrementar los niveles séricos de TAGs (43).

En un estudio realizado por Salazar et al. en 150 mujeres con y sin ECV (148); las mujeres con ECV presentaron niveles significativamente altos de CT, TAG y cLDL en comparación al grupo control y una mayor frecuencia del alelo $\epsilon 4$ y del genotipo $\epsilon 3\epsilon 4$. A diferencia de Freitas et al, en donde encontraron que los participantes con genotipo $\epsilon 2/\epsilon 4$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$ mantenían por lo menos un valor anormal de lípidos; pero el alelo $\epsilon 2$ se encontraba fuertemente asociado con bajos niveles séricos del CT y cLDL, sugiriendo este alelo como posible protector (136). En el presente estudio, no se evidencia que ninguno de los alelos epsilon tenga un comportamiento protector frente a la PE.

En estudios realizados por Eichner et al. (149) y Lehtinen et al. (150) se asociaron portadores del alelo $\epsilon 4$ con predisposición a desarrollar lesiones coronarias; sugieren que esto podría ser una consecuencia de disfunción metabólica de las lipoproteínas asociadas a dicha isoforma, produciendo elevación de CT y TAGs.

Aunque en nuestro estudio no se presentó asociación para los polimorfismos analizados (rs4398 y rs7412), si se evidencia una fuerte tendencia con el incremento de los niveles de ApoE, evidenciando la importancia de explorar otros polimorfismos del Gen APOE que puedan estar involucrados, u otros genes que codifiquen para proteínas que medien interacciones ligando-receptor.

Como posible debilidad del presente trabajo se encuentra la no genotipificación de otras variables que se han encontrado asociadas a los niveles de perfil lipídico como lo son: ABCA1, CETP, LPL, APOA5, APOC1, APOC2 y APOC4 (36), así mismo, genes asociados a la vía del estrés oxidativo como *MTHFR*, *PON-1*, *NADPH* y *AGTRI*. Esta debilidad podría ser subsanada en un futuro mediato con el estudio de asociación ampliada del genoma humano (GWAS, por su siglas en

inglés: Genome-Wide Association Study) realizado por GenPE (128), en donde se incluyeron inicialmente 4453 participantes (1973 casos y 2480 controles); y para replicación 1680 (1221 casos y 1459 controles), para un total de 7133 colombianas; se espera que estos resultados se encuentren disponibles para el 2016.

En conclusión, nuestros resultados muestran una clara asociación entre los niveles incrementados de TAGs y ApoE con PE. Asociación, que para ApoE muestra un gradiente según la severidad de la PE. Estos dos biomarcadores también han sido asociados de manera repetitiva con enfermedad cardiovascular, por lo tanto nuestros resultados, apoyan la hipótesis de una vía común entre PE y ECV. Sin embargo, no nos permite determinar si ApoE tiene un efecto causal sobre PE o es una consecuencia de la enfermedad.

BIBLIOGRÁFIA

Abbas AE1, Lester SJ, Connolly H. Pregnancy and the cardiovascular system *Int J Cardiol.* 2005 Feb 15;98(2):179-89.

ACOG Committee on Obstetric Practice ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists *Int J Gynecol Obstet.* 2002 Apr;77(1):67-75.

ACOG Committee on Practice Bulletins—Obstetrics ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol.* 2002 Jan;99(1):159-67.

Ahmadi R1, Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Kiani A, Jalilian N, Rahimi Z. Apolipoprotein E genotypes, lipid peroxidation, and antioxidant status among mild and severe preeclamptic women from western Iran: protective role of apolipoprotein ε2 allele in severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2012;31(4):405-18. doi: 10.3109/10641955.2012.690055. Epub 2012 Jun 7.

Ahmed R1, Dunford J1, Mehran R2, Robson S3, Kunadian V4. Pre-eclampsia and future cardiovascular risk among women: a review *J Am Coll Cardiol.* 2014 May 13;63(18):1815-22. doi: 10.1016/j.jacc.2014.02.529. Epub 2014 Mar 5.

Alsnes IV1, Janszky I2, Forman MR3, Vatten LJ4, Økland I5. A population-based study of associations between preeclampsia and later cardiovascular risk factors. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Dec;211(6):657.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2014.06.026. Epub 2014 Jun 17.

Anoop S, Misra A, Meena K, Luthra K Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases Indian J Med Res 2010 Oct;132:363-78.

Arngrimsson R, Björnsson S, Geirsson RT, Björnsson H, Walker JJ, Snaedal G. Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population Br J Obstet Gynaecol 1990;97:762–769.

Arrigo D, Lios S, Pituelli N, Rosillo I Frecuencia alélica de apolipoproteína E en una población aborigen Mem, Inst, Investig Cienc Salud 2006;4(1).

Ashavaid TF1, Todur SP, Nair KG. Apolipoprotein E polymorphism and coronary heart disease. J Assoc Physicians India. 2003 Aug;51:784-8.

Atkinson KR, Blumenstein M, Black MA, Wu SH, Kasabov N, Taylor RS, Cooper GJ, North RA; SCOPE Consortium An altered pattern of circulating apolipoprotein E3 isoforms is implicated in preeclampsia. J Lipid Res 2009 Jan;50(1):71-80.

Baker AM1, Klein RL, Moss KL, Haeri S, Boggess K. Maternal serum dyslipidemia occurs early in pregnancy in women with mild but not severe preeclampsia Am J Obstet Gynecol. 2009 Sep;201(3):293.e1-4.

Baksu B, Baksu A, Davas I, Akyol A, Gülbaba G Lipoprotein (a) levels in women with pre-eclampsia and in normotensive pregnant women J Obstet Gynecol Res. 2005;31:277–82.

Bazrgar M1, Karimi M, Fathzadeh M, Senemar S, Peiravian F, Shojaee A, Saadat M. Apolipoprotein E polymorphism in Southern Iran: E4 allele in the lowest reported amounts. Mol Biol Rep. 2008 Dec;35(4):495-9. Epub 2007 Jun 27.

Becker H, Berle P, Wallé A, Voigt KD Influence of late gestation and early puerperium on lipid and carbohydrate metabolism in normal females *Acta Endocrinol (Copenh)* 1971;67(3):570-6.

Belo L, Caslake M, Gaffney D, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintanilla A, et al Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies *Atherosclerosis*. 2002;162:425–32.

Belo L, Gaffney D, Caslake M, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintanilla A, Rebelo I. Apolipoprotein E and cholesteryl ester transfer protein polymorphisms in normal and preeclamptic pregnancies *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004 Jan 15;112(1):9-15.

Bellamy L1, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis *BMJ*. 2007 Nov 10;335(7627):974. Epub 2007 Nov 1.

Bennet AM1, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U, Danesh J. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007 Sep 19;298(11):1300-11.

Brown MC, Best KE, Pearce MS, Waugh J, Robson SC, Bell R Cardiovascular disease risk in women with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis *Eur J Epidemiol* 2013; 28:1–19.

Brunham LR1, Hayden MR2. Human genetics of HDL: Insight into particle metabolism and function. *Prog Lipid Res*. 2015 Apr;58:14-25.

Brunton PJ¹, Arunachalam S, Russel JA. Control of neuro hypophysial hormone secretion, blood osmolality and volume in pregnancy *J Physiol Pharmacol*. 2008 Dec;59 Suppl 8:27-45.

Buurma AJ, Turner RJ, Driessen JH, Mooyaart AL, Schoones JW, Bruijn JA, Bloemenkamp KW, Dekkers OM, Baelde HJ Genetic variants in pre-eclampsia: a meta-analysis *Human Reprod Update* 2013;19:289–303.

Carty DM, Delles C, Dominiczak AF Novel biomarkers for predicting preeclampsia *Trends Cardiovasc Med* 2008 Jul;18(5):186-94.

Catalano PM¹ Management of obesity in pregnancy *Obstet Gynecol*. 2007 Feb;109(2 Pt 1):419-33.

Cincotta RB, Brennecke SP Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. *Int J Gynecol Obstet* 1998;60:23–27.

Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Lichtenstein P. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation on preeclampsia *Am J Med Genet* 2004;130A: 365-71.

Corsetti JP¹, Bakker SJ, Sparks CE, Dullaart RP. Apolipoprotein A-II influences apolipoprotein E-linked cardiovascular disease risk in women with high levels of HDL cholesterol and C-reactive protein. *PLoS One*. 2012;7(6):e39110. doi: 10.1371/journal.pone.0039110. Epub 2012 Jun 18.

Chalas J, Audibert F, Francoual J, Le Bihan B, Frydman R, Lindenbaum A Concentrations of apolipoproteins E, C2, and C3 and lipid profile in preeclampsia *Hypertens Pregnancy* 2002;21(3):199-204.

Chikosi AB, Moodley J, Pegoraro RJ, Lanning PA, Rom LA. Polipoprotein E polymorphism in South African Zulu women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2000;19(3):309-14.

Daniels SR. Prevention of atherosclerotic cardiovascular disease: what is the best approach and how early should we start? *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jul 1;63(25 Pt A):2786-8. doi: 10.1016/j.jacc.2014.01.082. Epub 2014 May 7.

Demir B, Demir S, Atamer Y, Guven S, Atamer A, Kocyigit Y, Hekimoglu A, Toprak G. Serum levels of lipids, lipoproteins and paraoxonase activity in pre-eclampsia. *Int J Med Res* 2011;39 (4) :1427-31

Demirci O1, Tuğrul AS, Dolgun N, Sözen H, Eren S. Serum lipids level assessed in early pregnancy and risk of pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011 Oct;37(10):1427-32. doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01562.x. Epub 2011 Jun 16.

Demirkan A, van Duijn CM, Ugocsai P, Isaacs A, Pramstaller PP, Liebisch G, Wilson JF, Johansson Å, Rudan I, Aulchenko YS, Kirichenko AV, Janssens AC, Jansen RC, Gnewuch C, Domingues FS, Pattaro C, Wild SH, Jonasson I, Polasek O, Zorkoltseva IV, Hofman A, Karssen LC, Struchalin M, Floyd J, Igl W, Biloglav Z, Broer L, Pfeufer A, Pichler I, Campbell S, Zaboli G, Kolcic I, Rivadeneira F, Huffman J, Hastie ND, Uitterlinden A, Franke L, Franklin CS, Vitart V; DIAGRAM Consortium, Nelson CP, Preuss M; CARDIoGRAM Consortium, Bis JC, O'Donnell CJ, Franceschini N; CHARGE Consortium, Witteman JC, Axenovich T, Oostra BA, Meitinger T, Hicks AA, Hayward C, Wright AF, Gyllenstein U, Campbell H, Schmitz G; EUROSPAN consortium. Genome-wide association study identifies novel loci associated with circulating phospho- and sphingolipid concentrations. *PLoS Genet*. 2012;8(2):e1002490. doi: 10.1371/journal.pgen.1002490. Epub 2012 Feb 16.

Duckitt K1, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies *BMJ*. 2005 Mar 12;330(7491):565. Epub 2005 Mar 2.

Eichner JE1, Kuller LH, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum LM, Ferrell RE, Neaton JD. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease *Am J Cardiol*. 1993 Jan 15;71(2):160-5.

Enquobahrie DA, Williams MA, Butler CL, Frederick IO, Miller RS, Luthy DA. Maternal plasma lipid concentrations in early pregnancy and risk of preeclampsia *Am J Hypertens*. 2004;17:574–81.

Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, Varner MW. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia *N Engl J Med* 2001; 344:867–872.

Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis *Medicine (Baltimore)*. 1981 Jul;60(4):267-76.

Francoval J1, Audibert F, Claise C, Chalas J, Trioche P, Frydman R, Lindenbaum A. Implication of apolipoprotein E and the L-arginine-nitric oxide system in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 1999;18(3):229-37.

Fraser A1, Nelson SM, Macdonald-Wallis C, Cherry L, Butler E, Sattar N, Lawlor DA. Associations of pregnancy complications with calculated cardiovascular disease risk and cardiovascular risk factors in middle age: the Avon Longitudinal Study of Parents and Children Circulation. 2012 Mar 20;125(11):1367-80.

Freitas RG1, Campana EM1, Pozzan R1, Brandão AA1, Brandão AP1, Magalhães ME1, Silva DA1. APOE and LDLR Gene Polymorphisms and Dyslipidemia Tracking. Rio de Janeiro Study. *Arq Bras Cardiol.* 2015 May 5. pii: S0066-782X2015005050036.

Gallos ID, Sivakumar K, Kilby MD, Coomarasamy A, Thangaratnam S, Vatish M. Pre-eclampsia is associated with, and preceded by, hypertriglyceridaemia: a meta-analysis. *BJOG* 2013; 120:1321–1332.

Ganzevoort W1, Rep A, de Vries JI, Bonsel GJ, Wolf H; PETRA-investigators. Prediction of maternal complications and adverse infant outcome at admission for temporizing management of early-onset severe hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Aug;195(2):495-503. Epub 2006 Apr 27.

García AM. La apolipoproteína E: el polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos, los hábitos alimenticios y el origen étnico. *Rev Col Cardiol* 2003;10 (4): 189-93.

GenPE. Disponible en: <http://www.genpe.org/>

Germain S1, Nelson-Piercy C. Lupus nephritis and renal disease in pregnancy. *Lupus.* 2006;15(3):148-55

Ghulmiyyah L1, Sibai B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin Perinatol.* 2012 Feb;36(1):56-9.

Gnocchi D1, Pedrelli M2,3, Hurt-Camejo E3, Parini P4. Lipids around the Clock: Focus on Circadian Rhythms and Lipid Metabolism. *Biology (Basel).* 2015 Feb 5;4(1):104-32. doi: 10.3390/biology4010104

Gohil JT, Patel PK, Gupta P. Estimation of lipid profile in subjects of preeclampsia J Obstet Gynaecol India 2011; 61:399–403.

Gordon DJ, Rifkind B High-density lipoprotein: The clinical implications of recent studies N Engl J Med 1989;321:1311-6.

Greenland S Modeling and variable selection in epidemiologic analysis Am J Public Health 1989;79:340-9.

Haram K1, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review BMC Pregnancy Childbirth. 2009 Feb 26;9:8. doi: 10.1186/1471-2393-9-8.

Hermes W1, Franx A, van Pampus MG, Bloemenkamp KW, Bots ML, van der Post JA, Porath M, Ponjee GA, Tamsma JT, Mol BW, de Groot CJ. Cardiovascular risk factors in women who had hypertensive disorders late in pregnancy: a cohort study. Am J Obstet Gynecol. 2013 Jun;208(6):474.e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2013.02.016. Epub 2013 Feb 8.

Hermes W1, Franx A, van Pampus MG, Bloemenkamp KW, van der Post JA, Porath M, Ponjee G, Tamsma JT, Mol BW, de Groot CJ. 10-Year cardiovascular event risks for women who experienced hypertensive disorders in late pregnancy: the HyRAS study. BMC Pregnancy Childbirth. 2010 Jun 1;10:28.

Herz J1, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. Annu Rev Biochem. 2002;71:405-34. Epub 2001 Nov 9.

Hicks Gómez JJ Bioquímica 2 ed. México, D.F.: McGraw Hill, 2006. 125- 411. ISBN 970-10-5695-7

Huang Y. Mechanisms linking apolipoprotein E isoforms with cardiovascular and neurological diseases *Curr Opin Lipidol* 2010 Aug;21(4):337-45.

Huang Y1, Mahley RW2. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis.* 2014 Dec;72 Pt A:3-12.

Huang Y1, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell.* 2012 Mar 16;148(6):1204-22.

Huang Y1, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW. Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 2004;23(3):189-204.

Huang Y1. Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 2010 Jun;16(6):287-94.

Hubel CA, McLaughlin M, Evans RW Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated, and decrease within 48 hours post partum *Am J Obstet Gynecol* 1996;174: 975-982.

Huebbe P1, Nebel A, Siegert S, Moehring J, Boesch-Saadatmandi C, Most E, Pallauf J, Egert S, Müller MJ, Schreiber S, Nöthlings U, Rimbach G. APOE ε4 is associated with higher vitamin D levels in targeted replacement mice and humans *FASEB J.* 2011 Sep;25(9):3262-70.

Hunter DJ1. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet.* 2005 Apr;6(4):287-98.

IATA Reglamentación sobre Mercancías Peligrosas. Disponible en: www.iata.org

Ihle BU, Long P, Oats J. Early onset pre-eclampsia: recognition of underlying renal disease *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987 Jan 10;294(6564):79-81.

Jones PB, Adams K, Rozkalne A, Spires-Jones TL, Hshieh TT, Hashimoto T, von Armin CA, Mielke M, Hyman BT. Apolipoprotein E: isoform specific differences in tertiary structure and interaction with amyloid- β in human Alzheimer brain. *PLoS One* 2011 Jan;31;6(1):e14586.

Kayashima Y1, Makhanova NA1, Matsuki K1, Tomita H1, Bennett BJ2, Maeda N1. Identification of aortic arch-specific quantitative trait loci for atherosclerosis by an intercross of DBA/2J and 129S6 apolipoprotein E-deficient mice. *PLoS One*. 2015 Feb 17;10(2):e0117478. doi: 10.1371/journal.pone.0117478. eCollection 2015.

Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PFW. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review *Lancet*. 2006 Apr 1;367(9516):1066-7.

Knopp RH, Warth MR, Carrol CJ. Lipid metabolism in pregnancy. Changes in lipoprotein triglyceride and cholesterol in normal pregnancy and the effects of diabetes mellitus *J Reprod Med* 1973;10(3):95-101.

Kolovou G1, Kolovou V2, Mavrogeni S1. Lipidomics in vascular health: current perspectives. *Vasc Health Risk Manag*. 2015 Jun 12;11:333-42. doi: 10.2147/VHRM.S54874. eCollection 2015.

Koonin LM1, MacKay AP, Berg CJ, Atrash HK, Smith JC. Pregnancy-related mortality surveillance--United States, 1987-1990. *MMWR CDC Surveill Summ*. 1997 Aug 8;46(4):17-36.

L. Tobar, N. Coiza –Vargas Relación de los niveles séricos de lípidos y lipoproteínas con el polimorfismo E2, E3 y E4 del gen de la Apolipoproteína E, en individuos con diabetes mellitus tipo 2 y el riesgo cardiovascular UNIVERSITAS SCIENTIARUM. Revista de la Facultad de Ciencias. 2005; Vol. 10, 99-113

Landázuri P, Loango N, Gallego Diferencias de sexo, edad y lípidos plasmáticos asociadas al polimorfismo de la apolipoproteína E en un grupo de escolares de Quindío, Colombia Biomédica 2009; 29: 382-91

Lehtinen S1, Lehtimäki T, Sisto T, Salenius JP, Nikkilä M, Jokela H, Koivula T, Ebeling F, Ehnholm CApolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiographically verified coronary artery disease in men and women Atherosclerosis. 1995 Apr 7;114(1):83-91.

Li YH, Liu L1.Apolipoprotein E synthesized by adipocyte and apolipoprotein E carried on lipoproteins modulate adipocyte triglyceride content. Lipids Health Dis. 2014 Aug 23;13:136. doi: 10.1186/1476-511X-13-136.

Lima VJ, Andrade C, Ruschi GE, Sass N Serum lipid levels in pregnancies complicated by preeclampsia. Sao Paulo Med J 2011 Mar;129(2):73-6.

Magnussen EB, Vatten LJ, Lund-Nilsen TI, Salvesen KA, Davey Smith G, Romundstad PR Prepregnancy cardiovascular risk factors as predictors of pre-eclampsia: population based cohort study BMJ 2007;335:978-87

Mahaba HM, Ismail NA, El Damaty SI, Kamel HA Pre-eclampsia: Epidemiology and outcome of 995 cases J Egypt Public Health Assoc. 2001;76:357–68

Mahley RW1, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. J Clin Invest. 2007 Jan;117(1):94-8.

Mahley RW1, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res.* 1999 Jan;40(1):1-16.

Mahley RW1, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol.* 1999 Jun;10(3):207-17.

Mahley RW1. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988 Apr 29;240(4852):622-30.

Makkonen N, Heinonen S, Hiltunen M, Helisalmi S, Mannermaa A, Kirkinen P. Apolipoprotein E alleles in women with pre-eclampsia. *J Clin Pathol.* 2001 Aug;54(8):652-4.

Mao L1, Zhou Q, Zhou S, Wilbur RR, Li X. Roles of apolipoprotein E (ApoE) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in inflammation and apoptosis in preeclampsia pathogenesis and progression. *PLoS One.* 2013;8(3):e58168.

Mathers CD, Lopez AD, Murray CJL. The Burden of Disease and Mortality by Condition: Data, Methods, and Results for 2001 World Bank, Global burden of disease and risk factors. Washington, DC:2006.

Menzies J1, Magee LA, Macnab YC, Ansermino JM, Li J, Douglas MJ, Gruslin A, Kyle P, Lee SK, Moore MP, Moutquin JM, Smith GN, Walker JJ, Walley KR, Russell JA, von Dadelszen. CHS and NHBPEP criteria for severe preeclampsia do not uniformly predict adverse maternal or perinatal outcomes. *Hypertens Pregnancy.* 2007;26(4):447-62.

Mongraw-Chaffin ML1, Cirillo PM, Cohn BA. Preeclampsia and cardiovascular disease death: prospective evidence from the child health and development studies cohort. *Hypertension*. 2010 Jul;56(1):166-71.

Moreno Valladares Adriana, Cartagena Perdomo Álvaro E, y Mora Pabón Guillermo Apolipoproteína E Y Enfermedad Cardiovascular *Revista de la Facultad de Medicina*, 54 (1), 53-65

Mosca L1, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, Newby LK, Piña IL, Roger VL, Shaw LJ, Zhao D, Beckie TM, Bushnell C, D'Armiento J, Kris-Etherton PM, Fang J, Ganiats TG, Gomes AS, Gracia CR, Haan CK, Jackson EA, Judelson DR, Kelepouris E, Lavie CJ, Moore A, Nussmeier NA, Ofili E, Oparil S, Ouyang P, Pinn VW, Sherif K, Smith SC Jr, Sopko G, Chandra-Strobos N, Urbina EM, Vaccarino V, Wenger NK; American Heart Association. Effectiveness based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the American Heart Association *J Am Coll Cardiol*. 2011 Mar 22;57(12):1404-23. doi: 10.1016/j.jacc.2011.02.005.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Traducido por Gómez JE. *Bioquímica de Harper* 24 ed. México, D.F.: Manual Moderno, 1997. 279-332. ISBN 968-426-756-8

Myatt L, Miodovnik M Prediction of preeclampsia *Semin Perinatol*. 1999;23:45–57

Nagy B, Rigó JJr, Fintor L, Karádi I, Tóth T. Apolipoprotein E alleles in women with severe pre-eclampsia. *J Clin Pathol* 1998 Apr;51(4):324-5.

Nguyen D, Dhanasekaran P, Nickel M, Nakatani R, Saito H, Phillips MC, Lund-Katz S. Molecular basis for the differences in lipid and lipoprotein binding

properties of human apolipoproteins E3 and E4. *Biochemistry* 2010 Dec;28;49(51): 10881-9.

Nilsson E, Salonen Ros H, Cnattingius S, Lichtenstein P The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study *BJOG* 2004; 111:200–206.

ONU. Disponible en: www.un.org/spanish/millenniumgoals/. Consulta: 2012 Septiembre 14.

Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 May;82(10):3445-9.

Powe CE1, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011 Jun 21;123(24):2856-69. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.853127

Powe CE1, Thadhani R. Diabetes and the kidney in pregnancy *Semin Nephrol*. 2011 Jan;31(1):59-69.

Pozzi FS1, Maranhão RC2, Guedes LK3, Borba EF3, Laurindo IM3, Bonfa E3, Vinagre CG1. Plasma kinetics of an LDL-like non-protein nanoemulsion and transfer of lipids to high-density lipoprotein (HDL) in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Lipidol*. 2015 Jan-Feb;9(1):72-80. doi: 10.1016/j.jacl.2014.10.004. Epub 2014 Nov 4.

Procopciuc LM, Hazi G, Caracostea GN, Lleana o, Florin S. Apolipoprotein E polymorphisms a risk factor in Romanian pregnant women with preeclapsia *Obstetrics*. 2011. Vol 7. No 25.

Raichlen DA¹, Alexander GE². Exercise, APOE genotype, and the evolution of the human lifespan. *Trends Neurosci.* 2014 May;37(5):247-55. doi: 10.1016/j.tins.2014.03.001. Epub 2014 Mar 30.

Ray JG¹, Vermeulen MJ, Schull MJ, Redelmeier DA. Cardiovascular health after maternal placental syndromes (CHAMPS): population-based retrospective cohort study *Lancet.* 2005 19 Nov; 366 (9499) :1797-803.

Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:S1–22

Reyes LM¹, García RG, Ruiz SL, Camacho PA, Ospina MB, Aroca G, Accini JL, López-Jaramillo P. Risk factors for preeclampsia in women from Colombia: a case-control study *PLoS One.* 2012;7(7):e41622. doi: 10.1371/journal.pone.0041622. Epub 2012 Jul 23.

Roberts CL, Algert CS, Morris JM, Ford JB, Henderson-Smart DJ Hypertensive disorders in pregnancy: A population-based study *Med J Aust.* 2005;182:332–5

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association *Circulation.* 2012 Jan 3;125(1):e2-e220. doi: 10.1161/CIR.0b013e31823ac046

Roskoski RJ. Bioquímica México, D.F.:McGraw Hill, 2000. 161- 222. ISBN 970-10-1566-5

Salazar LA1, Hirata MH, Giannini SD, Forti N, Diament J, Lima TM, Hirata RD.Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. Clin Chim Acta. 2000 Oct;300(1-2):139-49.

Salonen Ros H, Lichtenstein P, Lipworth L, Cnattingius S. Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. Am J Hum Genet 2000;91: 256-560.

Sattar N, Bedomir A, Berry C, Shephard J, Greer IA, Packard CJ Lipoprotein subfraction concentrations in pre-eclampsia: pathogenic parallels to atherosclerosis Obstet Gynecol 1997;89(3):403-8.

Serrano NC, Immunology and genetic of preeclampsia Clinical & Developmental Immunology, June–December 2006; 13(2–4): 197–201

Serrano NC, Díaz LA Influencia de los factores genéticos y medio ambientales en la susceptibilidad para desarrollar preeclampsia. MedUNAB 2005;8: 159-163

Serrano NC, Páez MC, Martínez MP et al. Bases Genéticas y Moleculares de la Preeclampsia MedUNAB 2002;5: 185-194.

Sibai B, Dekker G, Kupferminc MPre-eclampsiaLancet. 2005;365:785–99

Sibai BM1, Mercer B, Sarinoglu C.Severe preeclampsia in the second trimester: recurrence risk and long-term prognosisAm J Obstet Gynecol. 1991 Nov;165(5 Pt 1):1408-12.

Sibai BM1, Stella CL. Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 May;200(5):481.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2008.07.048. Epub 2008 Nov 18.

Sibai BM1. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003 Jul;102(1):181-92.

Sibai BM1. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol.* 2004 May;103(5 Pt 1):981-91.

Silander K1, Alanne M, Kristiansson K, Saarela O, Ripatti S, Auro K, Karvanen J, Kulathinal S, Niemelä M, Ellonen P, Vartiainen E, Jousilahti P, Saarela J, Kuulasmaa K, Evans A, Perola M, Salomaa V, Peltonen L. Gender differences in genetic risk profiles for cardiovascular disease. *PLoS One.* 2008;3(10):e3615.

Sima AV, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res.* 2009;335:191–203.

Singh PP1, Singh M, Mastana SS. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Ann Hum Biol.* 2006 May-Jun;33(3):279-308.

Smith GC1, Pell JP, Walsh D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet.* 2001 Jun 23;357(9273):2002-6.

Smolková B1, Bonassi S2, Buociková V3, Dušinská M3, Horská A3, Kuba D4, Džupinková Z4, Rašlová K5, Gašparovič J6, Slíž I3, Ceppi M7, Vohnout B5, Wsóllová L8, Volkovová K3. Genetic determinants of quantitative traits associated with cardiovascular disease risk. *Mutat Res.* 2015 May 15;778:18-25.

Sotos-Prieto M1, Peñalvo JL. Genetic variation of apolipoproteins, diet and other environmental interactions; an updated review. *Nutr Hosp.* 2013 Jul-Aug;28(4):999-1009. doi: 10.3305/nh.2013.28.4.6475.

Spracklen CN, Smith CJ, Saftlas AF, Robinson JG, Ryckman KK. Maternal hyperlipidemia and the risk of preeclampsia: a meta-analysis *Am J Epidemiol* 2014; 180:346–358.

Takeuchi F1, Isono M, Katsuya T, Yokota M, Yamamoto K, Nabika T, Shimokawa K, Nakashima E, Sugiyama T, Rakugi H, Yamaguchi S, Ogihara T, Yamori Y, Kato N. Association of genetic variants influencing lipid levels with coronary artery disease in Japanese individuals. *PLoS One.* 2012;7(9):e46385

Tawfik HE1, Cena J, Schulz R, Kaufman S. Role of oxidative stress in multiparity-induced endothelial dysfunction *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Oct;295(4):H1736-42

Teixeira AA1, Marrocos MS, Quinto BM, Dalboni MA, Rodrigues CJ, Carmona Sde M, Kuniyoshi M, Batista MC. Diversity of apolipoprotein E genetic polymorphism significance on cardiovascular risk is determined by the presence of metabolic syndrome among hypertensive patients. *Lipids Health Dis.* 2014 Nov 20;13:174. doi: 10.1186/1476-511X-13-174.

Tian L1, Fu M. The relationship between high density lipoprotein subclass profile and plasma lipids concentrations. *Lipids Health Dis.* 2010 Oct 17;9:118. doi: 10.1186/1476-511X-9-118.

Torres A, Muñoz M, Sengrera A, Wagner J, Alvarado M. Modulación de los niveles de lípidos y lipoproteínas por el polimorfismo de la apolipoproteína E en individuos sanos de Bogotá. *D.C Revista Nova.* ISSN: 1794- 2470 2005 Junio;(3):1-120.

Uzan J 1 , Carbonnel M , Piconne O , Asmar R , Ayoubi JM . Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Manag de Riesgos de Salud*. 2011; 7:467-74. doi: 10.2147/VHRM.S20181. Epub 2011 19 de julio.

Velez-Pardo C1, Rojas W, Jimenez-Del-Rio M, Bedoya G. Distribution of APOE polymorphism in the "Paisa" population from northwest Colombia (Antioquia) *Ann Hum Biol*. 2015 Mar;42(2):195-8.

Vikse BE1. Pre-eclampsia and the risk of kidney disease. *Lancet*. 2013 Jul 13;382(9887):104-6

Wagner LK. Diagnosis and management of preeclampsia *Am. Fam Physician*. 2004 Dec 15;70(12):2317-24.

Weintraub WS, Daniels SR, Burke LE, Franklin BA, Goff DC Jr, Hayman LL, Lloyd-Jones D, Pandey DK, Sanchez EJ, Schram AP, Whitsel LP; American Heart Association Advocacy Coordinating Committee; Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on the Kidney in Cardiovascular Disease; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Cardiovascular Nursing; Council on Arteriosclerosis; Thrombosis and Vascular Biology; Council on Clinical Cardiology, and Stroke Council. Value of primordial and primary prevention for cardiovascular disease: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011 Aug 23;124(8):967-90. doi: 10.1161/CIR.0b013e3182285a81. Epub 2011 Jul 25.

Weisgraber KH, Innerarity T, Mahley RW Abnormal lipoprotein receptor binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchanges at a single site *J Biol Chem* 1982 Mar;10;257(5):2518-21.

Weisgraber KH1, Newhouse YM, Mahley RW. Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Dec 30;157(3):1212-7.

Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure function relationships. *Adv Protein Chem* 1994;45:249-302.

Wenger NK1. Recognizing pregnancy-associated cardiovascular risk factors *Am J Cardiol*. 2014 Jan 15;113(2):406-9.

Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1250-55

Winn VD, Gormley M, Fisher SJ. The Impact of Preeclampsia on Gene Expression at the Maternal-Fetal Interface *Pregnancy Hypertens*. 2011 Jan 1;1(1):100-108.

Wolf M1, Hubel CA, Lam C, Sampson M, Ecker JL, Ness RB, Rajakumar A, Daftary A, Shakir AS, Seely EW, Roberts JM, Sukhatme VP, Karumanchi SA, Thadhani R. Preeclampsia and future cardiovascular disease: potential role of altered angiogenesis and insulin resistance *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Dec;89(12):6239-43.

Wüstner D1, Solanko K2. How cholesterol interacts with proteins and lipids during its intracellular transport. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May 21. pii: S0005-2736(15)00158-3. doi: 10.1016/j.bbame.2015.05.010. [Epub ahead of print]

Xu H1, Li H1, Liu J1, Zhu D1, Wang Z1, Chen A1, Zhao Q1. Meta-analysis of apolipoprotein E gene polymorphism and susceptibility of myocardial infarction. *PLoS One*. 2014 Aug 11;9(8):e104608. doi: 10.1371/journal.pone.0104608. eCollection 2014.

Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia *Annu Rev Pathol.* 2010;5:173–92

Yousuf FA¹, Iqbal MP¹ Review: Apolipoprotein E (Apo E) gene polymorphism and coronary heart disease in Asian populations *Pak J Pharm Sci.* 2015 Jul;28(4):1439-44

Zhang MD¹, Gu W², Qiao SB³, Zhu EJ⁴, Zhao QM¹, Lv SZ¹ Apolipoprotein E gene polymorphism and risk for coronary heart disease in the Chinese population: a meta-analysis of 61 studies including 6634 cases and 6393 controls. *PLoS One.* 2014 Apr 22;9(4):e95463. doi: 10.1371/journal.pone.0095463. eCollection 2014.

Zuluaga N, Cuartas J, Londoño G. Genética de la preeclampsia; una aproximación a los estudios de ligamiento genético *Biomédica* 2004;24 (2) :207-25.

8. PRODUCCIÓN ACADÉMICA DURANTE LA MAESTRÍA

8.1 PRODUCCIÓN ACADÉMICA

PONENCIAS

1. XII Congreso Internacional del colegio nacional de bacteriología CNB-Colombia

Título: Estándares de calidad para colección de muestras biológicas en biobancos con fines de investigación.

Tipo de presentación: Ponencia en póster.

Lugar y fecha: Santiago de Cali, del 2 al 4 de noviembre de 2012.

Soporte: Anexo 9.

2. XLVII Congreso nacional de ciencias biológicas.

Título: Revisión de guías, normas jurídicas y éticas para la conformación de Biobancos con fines de investigación en Colombia.

Tipo de presentación: Ponencia Oral

Lugar y fecha: Santiago de Cali, del 9 al 13 de Octubre de 2012.

Soporte: Anexo 10.

3. XII Congreso Internacional del colegio nacional de bacteriología CNB-Colombia

Título: Estabilidad de las apolipoproteínas A1, B y E: Implicaciones en estudios observacionales a gran escala de muestras almacenadas en biobancos de investigación.

Tipo de presentación: Ponencia en póster.

Lugar y fecha: Santiago de Cali, del 2 al 4 de noviembre de 2012.

Soporte: Anexo 11.

4. XII Congreso Internacional del colegio nacional de bacteriología CNB-Colombia

Título: Ecuación Friedewald frente a la cuantificación del colesterol-LDL en gestantes colombianas.

Tipo de presentación: Ponencia en póster.

Lugar y fecha: Santiago de Cali, del 2 al 4 de noviembre de 2012.

Soporte: Anexo 12.

5. XLVII Congreso nacional de ciencias biológicas.

Título: Niveles séricos de apolipoproteína E asociados a pre-eclampsia e población colombiana.

Tipo de presentación: Ponencia en póster.

Lugar y fecha: Santiago de Cali, del 9 al 13 de Octubre de 2012.

Soporte: Anexo 13.

6. XII Congreso Internacional del colegio nacional de bacteriología CNB-Colombia

Título: Asociación entre fracciones lipídicas y Pre-eclampsia.

Tipo de presentación: Ponencia en póster.

Lugar y fecha: Santiago de Cali, del 2 al 4 de noviembre de 2012.

Soporte: Anexo 14.

7. XII Congreso Colombiano de Endocrinología, diabetes y metabolismo.

Título: Niveles séricos de apolipoproteínas asociados a pre-eclampsia.

Tipo de presentación: Ponencia en póster.

Lugar y fecha: Medellín, del 30 de mayo al 2 de junio de 2013

Soporte: Anexo 15.

8. III Congreso Latinoamericano de genética humana y XXXVIII Congreso nacional de genética humana

Título: Polimorfismos genéticos y niveles séricos de la apolipoproteína E asociados con pre-eclampsia: Estudio da gran escala en gestantes colombianas.

Tipo de presentación: Ponencia oral.

Lugar y fecha: Riviera Maya - México, del 20 al 23 de noviembre de 2013

Soporte: Anexo 16.

9. XIII Congreso Colombiano de genética humana y VII congreso internacional de genética humana.

Título: Asociación entre polimorfismos y niveles de apolipoproteína E y Pre-eclampsia en gestantes colombiana.

Tipo de presentación: Ponencia Oral

Lugar y fecha: Santiago de Cali, del 3 al 5 de septiembre de 2014

Reconocimiento: Primer premio a la investigación en genética Humana.

Asociación Colombiana de Genética Humana.

Soporte: Anexo 17.

10. Pasantía especializada.

Área: i) Biología molecular: Técnicas de extracción de DNA y RNA, síntesis de cDNA, ejecución de PCR y TR-PCR, y técnicas de secuenciación. ii) Citogenética molecular: Técnicas de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Lugar y fecha: Centro de investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca - España. Del 21 de octubre al 21 de noviembre de 2014.

Soporte: Anexo 18.

PUBLICACIONES

1. Artículo publicado.

Biomarcadores asociados a riesgo de síndrome metabólico: estudio en personal médico y administrativo de la facultad de Ciencias de la Salud de la UNAB - GENESIS II. Medunab /ISSN: 0123-7047. v.14 fasc.1 p.40 - 47 ,2011

Soporte: Anexo 19.

2. Artículo publicado

Serum concentrations of angiogenic factors as predictors of severity of preeclampsia in Colombian population". En: Reino Unido Pregnancy Hypertension. /ISSN: 2210-7789. ed: Elsevier. v.1 fasc.1 p.258 - 259 ,2011.

Soporte: Anexo 20.

3. Artículo publicado

Variables pre-analíticas que afectan la cuantificación sérica de Proteína C Reactiva e IL-6 en primigestantes preeclámpicas y controles sanos." Revista Salud Uis /ISSN: 2145-8464 ed: Universidad Industrial de Santander v.44 fasc.3 p.51 - 56 ,2012

Soporte: Anexo 21

4. Publicación

Polimorfismo +1444c>t de la proteína c-reactiva y su correlación con los niveles séricos de CRP: estudio colombiano de base poblacional. Revista de la asociación colombiana de ciencias biológicas /ISSN: 0120-4173. ed: asociación colombiana de ciencias biológicas. v.1 fasc.24 p.85 - 86 ,2012.

5. Publicación

Niveles séricos de apolipoproteína E asociados a preeclampsia en población colombiana. Revista de la asociación colombiana de ciencias

biológicas *ISSN*: 0120-4173. *Ed*: Asociación colombiana de ciencias biológicas. V.1 *fasc*.24 p.142 - 143 ,2012.

6. Publicación

Revisión de guías, normas jurídicas y éticas para la conformación de biobancos con fines de investigación en Colombia. Revista de la asociación colombiana de ciencias biológicas. *ISSN*: 0120-4173 *ed*: asociación colombiana de ciencias biológicas. v.1 *fasc*.24 p.153 - 154 ,2012.

7. Publicación

Estándares de calidad para colección de muestras biológicas de recién nacido en proyectos de investigación a gran escala. Revista de la asociación colombiana de ciencias biológicas *ISSN*: 0120-4173 *ed*: Asociación colombiana de ciencias biológicas. v.24 *fasc*.1 p.289 - 290 ,2012

8. Publicación

Variables pre-analíticas que afectan las concentraciones de homocisteína: Aplicación para biobancos con fines de investigación. *Medunab ISSN*: 0123-7047 *ed*: Universidad Autónoma De Bucaramanga Unab. v.16 *fasc*.2 p.59 - 64 ,2013.

8.2 PARTICIPACIÓN EN GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

1. Grupo estudio genético de enfermedades complejas. Universidad Autónoma de Bucaramanga (UNAB)

Categoría Colciencias: A1

Participación en proyectos de investigación

Biobanco CARDIECOL: Herramienta para la investigación Biomedica en enfermedad Cardio- Cerebro Vascular. Julio 2012 – Actual.

Homocisteína y Preeclampsia: evaluación de causalidad mediante ¿aleatorización mendeliana? Estudio multicéntrico colombiano a gran escala Enero 2008 a Diciembre 2011

Concentraciones séricas de factores angiogénicos (PLGF, VEGF, sFlt-1) como predictores de severidad en preeclampsia, en población colombiana. Enero 2008 Noviembre 2011

2. Grupo de Medicina genómica y metabolismo. Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV).

Categoría Colciencias: C

Participación en proyectos de investigación

Incidencia de la microdelección 22q11.2 en niños con cardiopatía congénita conotruncal: estudio en una institución colombiana de alta complejidad cardiovascular

Implementación de una metodología de Cromatografía Líquida de Ultra-resolución acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem para la cuantificación de Vitamina D en población colombiana.

8.3 CURSOS NO FORMALES (RELACIONADOS CON TÉCNICAS PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN)

1. Capacitación en analizador RxImola

Entidad: LabCare de Colombia

Fecha: Abril de 2012

2. Nombre: Capacitación Equipo VICTOR 2D
Entidad: Ropsohn Therapeutics Ltda
Fecha: Diciembre de 2012

3. Nombre: Capacitación en equipo Sistema de Hemoglobinas
Entidad: Ropsohn Therapeutics Ltda
Fecha: Diciembre de 2012

4. Nombre: Capacitación en Software GENASIS
Entidad: Andina de Tecnologías
Fecha: Enero de 2013

5. Nombre: Capacitación en Hibridación Fluorescente In Situ
Entidad: Andina de Tecnologías
Fecha: Febrero de 2013

6. Nombre: Capacitación del Equipo Delfia Xpress
Entidad: Ropsohn Therapeutics Ltda
Fecha: Febrero de 2013

7. Nombre: Curso de Propiedad Intelectual en el Ámbito Académico
Entidad: Universidad Autónoma de Bucaramanga
Fecha: Mayo de 2013

8. Nombre: Capacitación Teórico-Práctica en uso, montaje e interpretación de resultados en el sistema NanoDrop
Entidad: Am Limitada
Fecha: Agosto de 2013

ANEXOS

ANEXO A. ESTÁNDARES DE CALIDAD EN LA COLECCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DEL ESTUDIO GENPE.

Para confirmar la calidad de las muestras almacenadas en el estudio GenPE, se realizó un diagnóstico inicial sobre la calidad de muestras captadas de 2001 a 2007. A partir del año 2008 se implementaron protocolos de manejo, parámetros de calidad y estrategias de mejora de las muestras y de los datos recolectados por los centros de captación y el centro coordinador.

Previo a la selección de MBH del actual estudio, en el año 2011 se inició un análisis retrospectivo sobre el efecto del proceso de mejora implementado.

Resultados: Entre 2001 y 2011 fueron captadas 9121 pacientes (82917 viales almacenados). Del año 2008 al 2011 se evidenció un incremento del 37% en el promedio de pacientes/mes, pasando de 85 a 116 pacientes/mes. El bajo volumen de sangre presente en 83,9% de las muestras (diagnóstico 2007), llegó a ser <6% el último año. El ingreso de personal capacitado se reflejó en la calidad de las muestras, presentándose en 2011 hemólisis en solo 0,7% de los sueros y reduciendo en un 86,6% el tiempo entre toma de muestra y separación de componentes en los centros de captación (de 11,7 a 1,6 horas). En el centro coordinador el tiempo entre recepción de componentes y almacenamiento definitivo a -80°C, se mantuvo en un promedio de 78 minutos en los últimos 3 años.

Conclusión: La estandarización e implementación de estrategia para el control de calidad, en la recolección, manejo y almacenamiento de componentes sanguíneos, como plataforma para investigación poblacional a partir de colecciones de muestras con fines de investigación, permite generar un impacto positivo sobre la calidad del Material biológico que se almacena.

Estos resultados fueron presentados en el 12° Congreso internacional del colegio nacional de bacteriología CNB-Colombia en noviembre de 2012 (ver anexo 10).

En esta misma vía, se realizó una revisión sistemática sobre la normatividad para Biobancos a nivel nacional e internacional. Revisión que fue presentada en el XLVII Congreso nacional de Ciencias Biológicas (ver anexo 11).

Lo antes descrito, permitió conocer la trazabilidad y calidad de las muestras que ingresaron al actual estudio (“Impacto de los polimorfismos rs429358 y rs7412 de la ApoE, sobre los componentes del perfil lipídico, los niveles de Apolipoproteína E y su asociación la presencia de PE en población colombiana”).

ANEXO B. CERTIFICADO DE ENTRENAMIENTO RXIMOLA



Labcare de Colombia

certifica que

ELIZABETH GUIO MAHECHA

asistió a la conferencia/taller

CAPACITACION EN ANALIZADOR
IMOLA

realizada en Bogotá D.C. el/los día/s 13 del mes de Abril
del año 2012, con una intensidad de veinte horas.

Instructor:

* *Denisse Quiñones*

Carlos Alfredo Torres
Labcare de Colombia
Gerente



ANEXO C. ESTABILIDAD DE LOS BIOMARCADORES

Se realizó búsqueda de información en las principales bases de dato científicas sobre la estabilidad de las apolipoproteínas. Al no encontrar evidencia sobre la estabilidad de este analito bajo condiciones similares a las muestras almacenada por el estudio GenPE, se realizó una prueba para evaluar la reproducibilidad y estabilidad de las apolipoproteínas A1, B y E frente a las variables pre-analíticas (tiempo de almacenamiento y ciclos de congelación), para verificar su impacto sobre muestras almacenadas con fines investigación. Al contar con reactivos disponibles también se incluyó en este análisis Colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL.

Para esto, se captaron 88 adultos (51 mujeres y 37 hombres), a quienes se les extrajo sangre periférica la línea de control de calidad del MBH almacenado para garantizar una alta confiabilidad de la cuantificación de biomarcadores, se realizó búsqueda de información en en cinco tubos Vacutainer[®] sin anticoagulante. La muestra fue almacenada a 4°C para posterior centrifugación (3,000 rpm por 10 minutos), a tiempos de 1, 2, 6, 12 y 24 horas. Se separó el suero y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Las fracciones del tubo de 1 hora de almacenamiento a 4°C se sometieron hasta por 10 ciclos de descongelación.

Las apolipoproteínas fueron cuantificadas por inmunoensayo inmunturbidimétrico automatizado (Rxlmola-Randox[®]). El colesterol por el método enzimático de punto final (colesterol oxidasa); los triacilgliceroles por el método colorimétrico enzimático con lipasa (método GPO-PAP); y tanto HDL como LDL por el método clarificante directo.

Se estimó coeficiente de Lin (σ) y límites de acuerdo de Bland y Altman para evaluar reproducibilidad. El efecto de tiempo de múltiple, ajustados por el batch del

proceso, el donante y el valor inicial de cada analito. almacenamiento y de los ciclos se estimó por medio de modelos de regresión lineal.

Resultados: La medición de los biomarcadores fue altamente reproducible ($\sigma > 0.984$ para las apolipoproteínas y $\sigma > 0.993$ para los lípidos) y los límites de acuerdo simétricos y estrechos. En cuanto a tiempo entre toma de muestra y centrifugación, los analitos disminuyen por cada hora transcurrida (A1: -0.13%, B: -0.8%, E: -3.7%, COL -0.20%, HDL -0,73%, LDL -1,74% y TGS -0,18%); adicionalmente, la apo A1 se incrementan en un 3.4% y las apo E se disminuye en 0.8% por cada ciclo de congelación; los otros marcadores tienden a incrementar por cada ciclo (COL 0,76%, HDL 0,85%, LDL 0,27% y TGS 0,18%)

Conclusión: Los analitos presentaron una alta reproducibilidad, y una baja variabilidad en cuanto a variables pre-analíticas como ciclos de congelación y tiempo entre toma de muestra y centrifugación.

Lo antes descrito permitió tener una alta confiabilidad de la cuantificación de los biomarcadores para el actual estudio.

Los resultados de la estabilidad de las apolipoproteínas, fueron presentados en el 12° Congreso internacional del colegio nacional de bacteriología CNB-Colombia en noviembre de 2012 (ver anexo 12)

ANEXO D. CONTROL DE CALIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DE LAS TÉCNICAS SELECCIONADAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES.

Al iniciar el análisis de perfil lipídico, se evidenciaron valores extremos de HDL que no se ubicaban en la media poblacional según lo esperado para población colombiana. Debido a esta discrepancia se diseñó y aplicó una prueba de control de calidad con 60 muestras, con el fin de evaluar la reproducibilidad de la técnica empleada en todos los componentes de perfil lipídico y de esta manera tener certeza de la validez de los resultados. El proceso metodológico y sus resultados se presentan a continuación.

Se captaron 60 participantes, presuntamente sanos. Las muestras fueron procesadas con los mismos protocolos del Estudio GenPE; se realizó cuantificación por duplicado para los niveles séricos de cHDL, 20 de las cuales también fueron estudiadas (por duplicado) para CT y TAGs. Se escogieron dos laboratorios certificados, en diferentes ciudades (para excluir errores intra-laboratorio). Laboratorio A (Bogotá) y Laboratorio B (Bucaramanga).

La cuantificación de cHDL en el Laboratorio A (LA) se realizó con la técnica clarificante-directa de la casa comercial Randox, mientras que en Laboratorio B (LB) se realizó por medio de la técnica directa con la casa comercial Roche. Las mediciones de CT y de TAGs fueron hechas con la misma técnica (método enzimático de punto final y colorimétrico enzimático con Lipasa, respectivamente).

Para estimar la reproducibilidad de las pruebas se analizó la correlación existente entre las dos mediciones por medio de regresión lineal y los coeficientes β y de Lin, la diferencia promedio de las dos mediciones, estableciéndose su significancia estadística por medio de la prueba t pareada, y la inspección gráfica de la bondad de ajuste según lo propuesto por Bland y Altman.

En la tabla 1 se presentan los valores medios y su desviación estándar (DE) para cada analito y sus dos mediciones, así como la diferencia promedio y algunos de los coeficientes estimados para cada uno de ellos. En todas las mediciones pareadas hechas se encontró un menor valor en los reportes del LA frente al LB.

Tabla 25. Media y DE de las dos pruebas realizadas en los tres analitos evaluados.

Biomarcador	Promedio (DE)		Diferencia promedio	Prueba t pareada	Coeficiente de Lin (IC95%)	Coef ρ
	LA	LB				
cHDL	65.43 (1.97)	44.65 (1.47)	20.77 (1.23)	16.88 ($p < 0.001$)	0.339 (0.249-0.429)	0.781
Colesterol	253.2 (16.4)	213.2 (14.0)	40.0 (5.21)	7.68 ($p < 0.001$)	0.797 (0.682-0.912)	0.953
TG	279.0 (23.5)	245.1 (22.5)	34.9 (4.93)	7.08 ($p < 0.001$)	0.921 (0.866-0.976)	0.978

DE: Desviación estándar

HDL. Los valores reportados por el LB son entre un 13.9% y 72.7% inferiores a los reportados por el LA (media de 31.2%, DE 11.2%), diferencia que es estadísticamente significativa.

Colesterol. Los valores reportados en el LB son entre un 3.2% y 37.2% inferiores a los del LA (media de 15.4%, DE 8.1%), diferencia igualmente significativa. La correlación entre los dos valores es aceptable, como lo señalan los coeficientes β y de Lin, pero al menos 5 puntos del diagrama de dispersión quedan por fuera del intervalo de confianza de la línea de tendencia de la regresión lineal.

Triglicéridos. Los valores reportados por el LB son 0.5 a 31.2% inferiores a los reportados por el LA (media de 13.1%, DE 7.2%), diferencia también significativa.

Con base en los resultados expuestos, se presenta una pobre correlación entre las técnicas y se decide ampliar el número de población de estudio a 100 individuos; para replicar los análisis, por medio de técnicas automatizadas, con los mismos dos proveedores, siendo LA – Randox (Bogotá), y LB- Roche (Bucaramanga).

Para estimar la comparabilidad de los resultados de perfil lipídico generados con las técnicas comerciales de Roche y Randox, se estudiaron 100 personas con edad entre los 21 a 69 años, 52 mujeres, 48 hombres y en presunto buen estado de salud. Las mediciones fueron procesadas independientemente por ambas técnicas con una diferencia de un día. El tiempo previo de almacenamiento de las muestras osciló entre 10 y 214 días.

Valores crudos. En la tabla 2 se presenta el rango, mediana, rango intercuartil (RIQ), promedio y desviación estándar (DE) de los tres analitos para las dos técnicas. Dado que ninguna de las tres distribuciones es de naturaleza Gaussiana, se transformaron para colesterol y HDL a logarítmica ($\log x$) y para triglicéridos al recíproco de la raíz cuadrada ($1/\sqrt{x}$). De esta forma fue posible calcular el coeficiente de variación y comparar los resultados por medio de la prueba de Wilcoxon para datos pareados.

Tabla 26. Valores del perfil lipídico según las dos técnicas analizadas

Biomarcador	Rango	Mediana (RIQ)	Media (DE)*	Media (DE) Transformada*	Coef de variación	Valor de p***
<i>Colesterol</i>						
Randox	75.5-355.7	184.3 (157-215.7)	189.7 (48.4)	5.21 (0.26)	4.99%	(Z=4.038) p=0.0001
Roche	109-342	175.5 (148.5-212.0)	181.6 (41.2)	5.18 (0.22)	4.25%	
<i>HDL</i>						
Randox	23.2-88.0	47.6 (41.3-55.2)	49.5 (12.4)	3.87 (0.25)	6.46%	(Z=8.682) p<0.0001
Roche	7.2-65.5	35.4 (28.9-40.5)	35.5 (10.0)	3.52 (0.32)	9.09%	
<i>Triglicéridos</i>						
Randox	36.4-421	99.4 (66.1-142.5)	118.3 (74.0)	0.098 (0.026)	26.53%	(Z=1.451) p=0.147
Roche	45-1,680	102.0 (69.5-155.5)	144.1 (178.2)	0.103 (0.026)	25.24%	

* Ninguno de los parámetros tiene distribución normal. ** La transformación para Colesterol y HDL es logarítmica ($\log x$); para triglicéridos el recíproco de la raíz cuadrada ($1/\sqrt{x}$). *** Prueba de Wilcoxon para datos pareados

Los resultados muestran que los niveles cuantificados por las dos técnicas son diferentes para CT y para cHDL, más no así para TAGs. Sin embargo, esta aparente equivalencia está dada más por la gran variabilidad del analito en las pruebas que por real equivalencia.

Conclusión. Teniendo en cuenta el análisis previo, se llega a la conclusión que los valores generados por las dos técnicas son diferentes, en particular los de cHDL, para los cuales la técnica de Roche genera, en promedio, valores 14 mg/dL por debajo de lo reportado por Randox. Esto se traduce en que, al utilizar los puntos de corte universalmente aceptados por HDL, la prueba de Roche clasifique más personas por debajo de los valores de normalidad que la prueba de Randox. Aunque las concentraciones para cHDL obtenidas por la técnica de Randox, son mayores, se evidencia que es inherente a una mayor recuperación del analito en la muestra de suero.

Una vez terminado el análisis, se tomó la decisión de continuar la cuantificación de los analitos por la técnica de Randox, teniendo en cuenta la sensibilidad y reproducibilidad de la técnica, el equipo automatizado y el soporte técnico de la casa comercial.

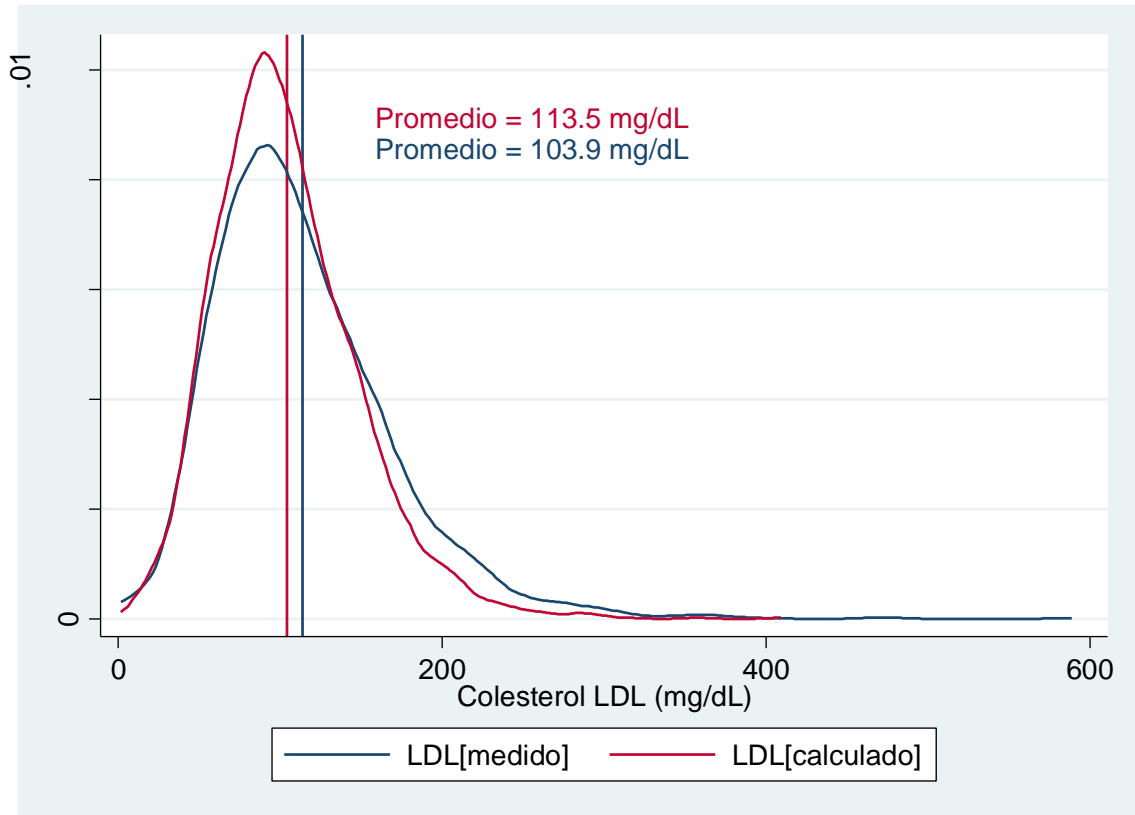
ANEXO E. ANÁLISIS DE DESEMPEÑO DE C-LDL MEDIDO (C-LDLM) VERSUS SU ESTIMACIÓN MEDIANTE LA ECUACIÓN DE FRIEDWALD (C-LDLC).

El cLDL es importante en la estimación del riesgo cardiovascular y ha sido usado como valor predictivo. La mayoría de laboratorios clínicos informan las concentraciones de cLDL por fórmula de Friedwald. Esta expresión depende de las determinaciones de cHDL, TAGs y el CT. Algunos reportes en la literatura indican que su aplicación tiene limitaciones.

Teniendo la oportunidad de comparar las muestras cuantificadas vs la ecuación; se incluyeron 3.190 muestras de primigestantes, captadas por el Estudio GenPE. Para la cuantificación de los biomarcadores: Colesterol total (Colesterol oxidasa), triacilglicerol (GPO-PAP), cHDL y cLDL (Clarificante directo), se utilizó el equipo RxImola con reactivos de Randox. El cLDL también se estimó mediante la ecuación de Friedelwald para las muestras con TAGs <400 mg/dL. La ecuación de Friedwald empleada para estimar el cLDL fue: $C-LDLC = CT - C-HDL - TAGs/5$.

Resultados: El promedio entre los valores obtenidos por ambos métodos fueron de 103.9 mg/dL para la cuantificación directa del c-LDL y de 113.5 mg/dL para los valores hallados por la ecuación Friedelwald (ver figura 1). Los límites de acuerdo para el rango de diferencia se determinaron entre 56.3 - 75.0 mg/dL.

Figura 6. Promedio obtenido entre los valores obtenidos por ambos métodos



Para evaluar la concordancia entre las dos técnicas se utilizó el método de Bland-Altman. Encontrando que existe un buen coeficiente de correlación matemáticamente aceptable entre los dos métodos, Pearson ($r=0.81$ ($p<0.05$)) y Spearman ($r=0.79$ ($p<0.05$)). Sin embargo, partiendo de la diferencia promedio entre ellos (9.6 mg/dL, IC95% 8.5-10.8), la no correlación de los valores extremos y sus implicaciones en la interpretación clínica, se recomienda su cuantificación directa para la mejor identificación de pacientes con riesgo cardiovascular

Estos resultados fueron presentados en el 12° Congreso internacional del colegio nacional de bacteriología CNB-Colombia en noviembre de 2012 (ver anexo 13)

ANEXO F. POLIMORFISMO RS429358 Y RS7412

Frecuencias reportes en HapMap y 1000 Genomas para los Polimorfismos rs429358 y rs7412 de la APOE.

Tabla 27. rs429358 HapMap

Population	ssID	Alleles C	Alleles T	Genotypes C T	Genotypes T T
CSHL-HAPMAP-HCB	ss76884559		1,000		1,000
CSHL-HAPMAP-JPT	ss76884559	0.011	0.989	0.023	0.977
CSHL-HAPMAP-YRI	ss76884559	0.017	0.983	0.033	0.967
CSHL-HAPMAP-CEU	ss168243995	0.5	0.5	1,000	

Tabla 28. rs429358 -100 Genomas

Population	Alleles C	Alleles T	Genotypes C C	Genotypes C T	Genotypes T T
01000GENOMES:phase_3_ALL	0.151	0.849	0.028	0.244	0.727
1000GENOMES:phase_3_ACB	0.255	0.745	0.073	0.365	0.562
1000GENOMES:phase_3_AFR	0.268	0.732	0.074	0.387	0.539
1000GENOMES:phase_3_AMR	0.104	0.896	0.006	0.196	0.798
1000GENOMES:phase_3_ASN	0.086	0.914	0.008	0.157	0.835
1000GENOMES:phase_3_ASW	0.205	0.795	0.033	0.344	0.623
1000GENOMES:phase_3_BEB	0.087	0.913	0.012	0.151	0.837
1000GENOMES:phase_3_CDX	0.102	0.898		0.204	0.796
1000GENOMES:phase_3_CEU	0.177	0.823	0.020	0.313	0.667
1000GENOMES:phase_3_CHB	0.102	0.898		0.204	0.796
1000GENOMES:phase_3_CHS	0.057	0.943		0.114	0.886
1000GENOMES:phase_3_CLM	0.154	0.846	0.021	0.266	0.713
1000GENOMES:phase_3_ESN	0.242	0.758	0.061	0.364	0.576
1000GENOMES:phase_3_EUR	0.155	0.845	0.022	0.266	0.712
1000GENOMES:phase_3_FIN	0.187	0.813	0.040	0.293	0.667
1000GENOMES:phase_3_GBR	0.176	0.824	0.044	0.264	0.692
1000GENOMES:phase_3_GIH	0.049	0.951	0.010	0.078	0.913
1000GENOMES:phase_3_GWD	0.274	0.726	0.080	0.389	0.531
1000GENOMES:phase_3_IBS	0.140	0.860	0.009	0.262	0.729
1000GENOMES:phase_3_ITU	0.083	0.917		0.167	0.833
1000GENOMES:phase_3_JPT	0.082	0.918	0.019	0.125	0.856

Population	Alleles C	Alleles T	Genotypes C C	Genotypes C T	Genotypes T T
1000GENOMES:phase_3_KHV	0.091	0.909	0.020	0.141	0.838
1000GENOMES:phase_3_LWK	0.379	0.621	0.152	0.455	0.394
1000GENOMES:phase_3_MSL	0.259	0.741	0.059	0.400	0.541
1000GENOMES:phase_3_MXL	0.086	0.914		0.172	0.828
1000GENOMES:phase_3_PEL	0.059	0.941		0.118	0.882
1000GENOMES:phase_3_PJL	0.083	0.917	0.010	0.146	0.844
1000GENOMES:phase_3_PUR	0.106	0.894		0.212	0.788
1000GENOMES:phase_3_SAS	0.087	0.913	0.010	0.153	0.836
1000GENOMES:phase_3_STU	0.132	0.868	0.020	0.225	0.755
1000GENOMES:phase_3_TSI	0.103	0.897		0.206	0.794
1000GENOMES:phase_3_YRI	0.236	0.764	0.046	0.380	0.574

Tabla 29. rs7412 HapMap

Population	ssID	Alleles C	Alleles T	Genotypes C C	Genotypes C T	Genotypes T T
CSHL-HAPMAP-ASW	ss107936539	0.875	0.125	0.771	0.208	0.021
CSHL-HAPMAP-CHB	ss107936539	0.878	0.122	0.756	0.244	
CSHL-HAPMAP-CHD	ss107936539	0.917	0.083	0.833	0.167	
CSHL-HAPMAP-GIH	ss107936539	0.948	0.052	0.908	0.080	0.011
CSHL-HAPMAP-HCB	ss107936539	0.905	0.095	0.810	0.190	
CSHL-HAPMAP-JPT	ss107936539	0.946	0.054	0.893	0.107	
CSHL-HAPMAP-LWK	ss107936539	0.948	0.052	0.895	0.105	
CSHL-HAPMAP-MEX	ss107936539	0.939	0.061	0.878	0.122	
CSHL-HAPMAP-TSI	ss107936539	0.959	0.041	0.918	0.082	
CSHL-HAPMAP-YRI	ss107936539	0.905	0.095	0.809	0.191	
CSHL-HAPMAP-CEU	ss168244006	0,5	0,5		1,00	

Tabla 30. rs7412 -1000 Genomas

Population	Alleles C	Alleles T	Genotypes C C	Genotypes C T	Genotypes T T
01000GENOMES:phase_3_ALL	0.925	0.075	0.855	0.139	0.006
1000GENOMES:phase_3_ACB	0.875	0.125	0.760	0.229	0.010
1000GENOMES:phase_3_AFR	0.897	0.103	0.802	0.191	0.008
1000GENOMES:phase_3_AMR	0.952	0.048	0.908	0.089	0.003
1000GENOMES:phase_3_ASN	0.900	0.100	0.808	0.185	0.008
1000GENOMES:phase_3_ASW	0.869	0.131	0.754	0.230	0.016
1000GENOMES:phase_3_BEB	0.948	0.052	0.907	0.081	0.012

1000GENOMES:phase_3_CDY	0.898	0.102	0.806	0.183	0.011
1000GENOMES:phase_3_CEU	0.934	0.066	0.869	0.131	
1000GENOMES:phase_3_CHB	0.893	0.107	0.786	0.214	
1000GENOMES:phase_3_CHS	0.924	0.076	0.848	0.152	
1000GENOMES:phase_3_CLM	0.915	0.085	0.840	0.149	0.011
1000GENOMES:phase_3_ESN	0.949	0.051	0.899	0.101	
1000GENOMES:phase_3_EUR	0.937	0.063	0.877	0.121	0.002
1000GENOMES:phase_3_FIN	0.929	0.071	0.859	0.141	
1000GENOMES:phase_3_GBR	0.923	0.077	0.857	0.132	0.011
1000GENOMES:phase_3_GIH	0.961	0.039	0.932	0.058	0.010
1000GENOMES:phase_3_GWD	0.867	0.133	0.752	0.230	0.018
1000GENOMES:phase_3_IBS	0.944	0.056	0.888	0.112	
1000GENOMES:phase_3_ITU	0.951	0.049	0.912	0.078	0.010
1000GENOMES:phase_3_JPT	0.952	0.048	0.904	0.096	
1000GENOMES:phase_3_KHV	0.828	0.172	0.687	0.283	0.030
1000GENOMES:phase_3_LWK	0.955	0.045	0.909	0.091	
1000GENOMES:phase_3_MSL	0.859	0.141	0.729	0.259	0.012
1000GENOMES:phase_3_MXL	0.953	0.047	0.906	0.094	
1000GENOMES:phase_3_PEL	0.994	0.006	0.988	0.012	
1000GENOMES:phase_3_PJL	0.964	0.036	0.927	0.073	
1000GENOMES:phase_3_PUR	0.952	0.048	0.904	0.096	
1000GENOMES:phase_3_SAS	0.956	0.044	0.918	0.076	0.006
1000GENOMES:phase_3_STU	0.956	0.044	0.912	0.088	
1000GENOMES:phase_3_TSI	0.953	0.047	0.907	0.093	
1000GENOMES:phase_3_YRI	0.894	0.106	0.787	0.213	

ANEXO G. SELECCIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA GENOTIPIFICACIÓN

Diferentes métodos para genotipificación incluyen análisis de secuencias, PCR convencional alelo específica (AS-PCR), RFLP con enzimas de restricción (Crook R 1994), resonancia de fluorescencia por transferencia de energía (FRET) usando sistemas de PCR en tiempo real (Park CH 2010). Una de las alternativas más exitosas es la técnica de genotipado de APOE, mediante FRET con el equipo LightCycler (técnica descrita por Aslanidis et al en 1999 y por productos Roche® en el 2000) (Crook R 1994, Park CH 2010). El sistema FRET consta de un oligonucleótidos complementario de la secuencia salvaje o la mutada, que contiene la base polimórfica en la mitad de su secuencia, y tiene un fluoróforo LC-red640 en su extremo 5'. Un segundo primer de hibridación (primer anchor), se encuentra cuesta arriba a tres nucleótidos, y está marcada con fluoresceína en su extremo 3'. La genotipificación basada en análisis de curvas melting (MCA), se fundamenta en las diferentes temperaturas melting (T_m) de la misma sonda, cuando diferentes alelos están presentes (T_m: es la temperatura a la que el 50% de un dúplex de DNA particular se disocia y se convierte en DNA de cadena sencilla). Frances F et al, desarrollaron y validaron un protocolo multiplex, para la determinación del genotipo APOE (codón 112 y 158), mediante sondas fluorescentes. Obteniendo resultados de alta calidad, interferencias mínimas entre señales de la sonda y con una concordancia del 100%, al compararlo con el protocolo de referencia RFLP (curves 1999, Aslanidis C 1999).

En esta misma línea, Rihn et al en 2009 (Rihn BH 2009), y Park et al en 2010 (Park CH 2010), compararon la genotipificación por FRET con RFLP y secuenciación. Los autores recomiendan que para la técnica de RFLP es necesario realizar una segunda genotipificación para los resultados homocigotos aplicando la técnica FRET o secuenciación; lo anterior, debido a un porcentaje de error en la detección de heterocigotos, por esta razón las técnicas de elección son FRET y secuenciación (Park CH 2010, Francés F 2008).

Basados en lo descrito previamente, fue seleccionado el método de genotipificación por discriminación alélica, usando sondas de hibridación específica, que aplican la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET), utilizando un termociclador de tiempo real LightCycler®480 (Roche®) (Nauck M 2000).

Descripción del equipo: El LightCycler® 480 es un sistema de alto rendimiento de PCR en tiempo real, con plataforma flexible basado en la placa de PCR de 96 pozos que conduce a homogeneidad del pozo a pozo y maximiza la sensibilidad de detección. Soporta aplicaciones mono-o multicolor, así como protocolos múltiplex, que proporciona varios métodos para la detección cualitativa y cuantitativa de ácidos nucleicos, rastreo de la mutación, y el análisis de SNP. Utiliza métodos básicos y avanzados para la expresión génica y de genotipificación basado en el análisis de punto final o de curvas de fusión, con una amplia variedad de formatos de sondas (*por ejemplo*, FRET o HybProbe sondas, sondas SimpleProbe, sondas de hidrólisis) y los tintes fluorescentes (*por ejemplo*, SYBR Green I, ResoLight Dye, FAM, HEX, Cy5, LightCycler® Rojo 610, LightCycler® Red 640, y LightCycler® CIAN 500).

Para la genotipificación del actual proyecto se usó el Kit LightMix ApoE C112R R158C (Roche®) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Secuencias de primer:

rs429358 (codón 112)

5' -ACATGGAGGACGTGCGCGG-3'

5' -CTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGC-3'

rs7412 (codón 158)

5'-GACCTGCAGAAGCGCCTGGC-3'

5'-GCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCG-3'

Figura 7. Mezcla maestra (MasterMix): Todos los componentes son suministrados en el kit.

Componente	Volumen en μ l
Agua grado PCR	8,2
Mg ²⁺ (solución 25 mM)	1,6
Reactivo mix (contiene primer y sonda)	2,0
DMSO (dimetilsulfóxido)	1,2
Master HyProbe	2,0
Volumen de reacción final	15

Los fragmentos de PCR fueron analizados con sondas simples (APOE C112R, detectada en el canal 530) y con sondas marcadas con rojo 640 (APOE R158C, detectada en el canal 640). El codón de la APOE 112 se muestra en el canal 530 a una temperatura melting (T_m), de 49°C para la variante alélica 112C, y a una T_m de 59°C para la variante 112R. El codón de la APOE 158 se muestra en el canal 640 con una T_m de 63°C para la variante 158R, y a una T_m de 53°C para la variante 158C.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen final de 15 μ l usando un protocolo de cuatro pasos: i) denaturalización a 95°C por 10 minutos, ii) Ciclaje: 45 ciclos con denaturalización (95°C por 5 segundos), alineación (60°C por 10 segundos), y extensión (72°C por 15 segundos); iii) Curva melting (95°C por 20 segundos, 40°C por 20 segundos y 85°C por 0.2 segundos); y iv) enfriamiento a 4°C por 30 segundos (50). A medida que avanza la PCR el genotipo de cada muestra es automáticamente atribuido a la medición de la fluorescencia alelo específico en el termociclador citado.

Como control de calidad el 10% de las muestras de DNA, escogidas al azar, fueron sometidas a una segunda genotipificación, usando la misma metodología.

Interpretación de resultados: Las muestras fueron identificadas como E3, E2 ó E4, según las Tm identificadas en cada canal así:

Tabla 31. Muestras identificadas como E3, E2 ó E4, según las Tm

Marcador	ApoE3	ApoE2	ApoE4
	112C 158R	112C 158C	112R 158R
Identificación de picos – Temperatura Melting (Tm).	49°C (530 nm) 63°C (640 nm)	49°C (530 nm) 53°C (640 nm)	59°C (530 nm) 63°C (640 nm)

Aunque el software del equipo analiza las Tm identificadas, se realizó verificación de los picos de cada una de las muestras con el fin de efectuar un control de calidad en el análisis.

Todos los análisis de laboratorio se hicieron de manera enmascarada, sin conocer el estado caso-control de las muestras

Referencias

Aslanidis C, Schmitz G. "High-speed apolipoprotein E genotyping and apolipoprotein B3500 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting curves." (Clin Chem 1999 Jul;45(7):1094-7.) 1999.

Crook R, Hardy J, Duff K. "Single-day apolipoprotein E genotyping." (J Neurosci Methods 1994 Aug;53(2):125-7.) 1994.

curves, High-speed apolipoprotein E genotyping and apolipoprotein B3500 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting. "Aslanidis C, Schmitz G." (Clin Chem 1999 Jul;45(7):1094-7.) 1999.

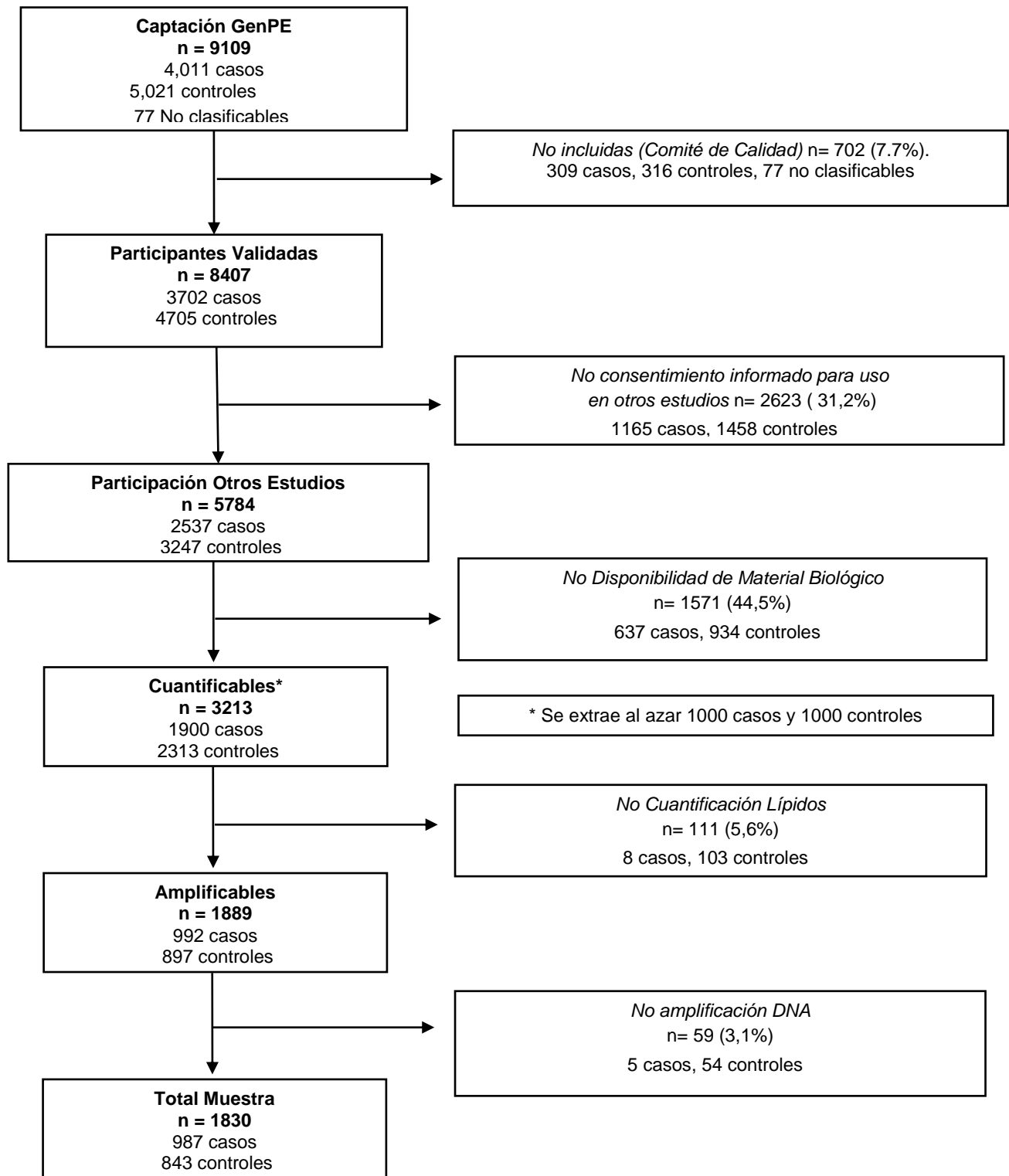
Francés F, Portolés O, Sorlí JV, Guillén M, González JI, Corella D. "Single tube optimisation of APOE genotyping based on melting curve analysis." (Clin Biochem 2008 Jul;41(10-11):923-6.) 2008.

Nauck M, Hoffman M, Wieland H, März W. "Evaluation of the apo E genotyping kit on the LightCycler." (Clin Chem 2000 May;46(5):722-4.) 2000.

Park CH, Lee LS, Ki CS, Kim JW. "Discrepancy in genotyping of apolipoprotein E between allele-specific PCR and fluorescence resonance energy transfer or sequencing." (Korean J Lab Med 2010 Jun;30(3):325-8.) 2010.

Rihn BH, Berrahmoune S, Jouma M, Chamaa S, Marcocci L, Le Faou A. "APOE genotyping: comparison of three methods." (Clin Exp Med 2009 Mar;9(1):61-5) 2009.

ANEXO H. FLUJOGRAMA PROCESO DE SELECCIÓN DE MUESTRAS



ANEXO I. CERTIFICADO CONGRESO. ESTÁNDARES DE CALIDAD PARA COLECCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS



EL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA

CERTIFICA QUE

El trabajo de investigación

"ESTÁNDARES DE CALIDAD PARA COLECCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS EN BIOBANCOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN".

Cuyos autores son:

Guío Elizabeth, Serrano Norma, Hernández Jessica, Daza Cindy, Bautista Paula, Luna Lucrecia, Páez María Carolina.

Participó en la modalidad de Poster, en el 12º CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA, realizado en el Centro de Eventos Valle del Pacífico de la ciudad de Cali durante los días 2, 3 y 4 de noviembre de 2012.

Cali, 4 de noviembre de 2012

Stella Páez de Bolívar
STELLA PÁEZ DE BOLIVAR
Presidenta CNB – COLOMBIA

Maria Eugenia González Rodríguez
MARÍA EUGENIA GONZALEZ RODRIGUEZ
Presidenta Congreso CNB-COLOMBIA

Claudia Lucía Villegas Gu
Coordinadora Comité Académico
12º Congreso CNB-COLOMBIA

ANEXO J. CERTIFICADO CONGRESO. REVISIÓN DE GUÍAS, NORMAS JURÍDICAS Y ÉTICAS PARA BIOBANCOS



XLVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas

La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas
Certifica que:

*NORMA C. SERRANO, MARÍA CAROLINA PÁEZ, ELIZABETH QUIÑO
MAHECHA, PAULA K. BACOSTA, CINDY TAMARA DAZA*

En el marco del XLVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas "Biología Sistémica Integración del Conocimiento Biológico" que se realizó en la ciudad de Santiago de Cali del 9 de al 13 Octubre del 2012 presentaron la ponencia REVISIÓN DE GUÍAS, NORMAS JURÍDICAS Y ÉTICAS PARA LA CONFORMACIÓN DE BIOBANCOS CON FINES DE INVESTIGACIÓN EN COLOMBIA


Felipe Garcia Vallejo.
Presidente Junta Directiva Nacional


Leonidas Zambrano Polanco.
Secretario Junta Directiva Nacional


Jose Maria Satizabal Soto.
Presidente 47 Congreso Nacional Ciencias Biológicas



**ANEXO K. CERTIFICADO CONGRESO. ESTABILIDAD DE LAS
APOLIPOPROTEÍNAS A1, B Y E.**



EL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA

CERTIFICA QUE

*El trabajo de investigación
"ESTABILIDAD DE LAS APOLIPOPROTEÍNAS A1, B Y E: IMPLICACIONES EN ESTUDIOS
OBSERVACIONALES A GRAN ESCALA DE MUESTRAS ALMACENADAS EN BIOBANCOS DE
INVESTIGACIÓN".*

Cuyos autores son:

Guío Elizabeth, Serrano Norma, Díaz Luis Alfonso, Páez María Carolina, Bautista Paula,
Mantilla Gerardo.

*Participó en la modalidad de Poster, en el 12º CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO
NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA, realizado en el Centro de Eventos Valle
del Pacífico de la ciudad de Cali durante los días 2, 3 y 4 de noviembre de 2012.*

Cali, 4 de noviembre de 2012

Stella P de Bolívar
STELLA PÁEZ DE BOLIVAR
Presidenta CNB – COLOMBIA

Maria Eugenia González
MARIA EUGENIA GONZALEZ RODRIGUEZ
Presidenta Congreso CNB-COLOMBIA

Claudia Lucía Villegas Gu
Coordinadora Comité Académico
12º Congreso CNB-COLOMBIA

ANEXO L. CERTIFICADO CONGRESO. ECUACIÓN FREDEWALD FRENTE A CUANTIFICACIÓN DEL C-LDL



COLEGIO NACIONAL
DE BACTERIOLOGÍA
CNB-COLOMBIA



2, 3, 4 DE NOVIEMBRE DE 2012
CENTRO DE EVENTOS VALLE DEL PACÍFICO
CALI VALLE COLOMBIA



COLBAV
Collegio de Bacteriología
y Laboratorias Clínicas
del Valle del Cauca

EL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA

CERTIFICA QUE

El trabajo de investigación
"ECUACIÓN FRIEDEWALD FRENTE A LA CUANTIFICACIÓN DEL COLESTERO-LDL EN
GESTANTES COLOMBIANAS".

Cuyos autores son:

Serrano Norma, Páez María Carolina, Guío Elizabeth, Mantilla Gerardo, Bautista Paula,
Herrera Victor

*Participó en la modalidad de Poster, en el 12º CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO
NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA, realizado en el Centro de Eventos Valle
del Pacífico de la ciudad de Cali durante los días 2, 3 y 4 de noviembre de 2012.*

Cali, 4 de noviembre de 2012

Stella P de Bolívar
STELLA PÁEZ DE BOLIVAR
Presidenta CNB – COLOMBIA

María Eugenia González Rodríguez
MARIA EUGENIA GONZALEZ RODRIGUEZ
Presidenta Congreso CNB-COLOMBIA

Claudia Lucía Villegas Gu
Coordinadora Comité Académico
12º Congreso CNB-COLOMBIA

**ANEXO M. CERTIFICADO CONGRESO. NIVELES SÉRICOS DE
APOLIPOPROTEINA E ASOCIADOS A PRE-ECLAMPSIA**



XLVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas

La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas
Certifica que:

Guío-Mahecha E, Serrano NC, Páez-Leal MC, Mantilla-Mora G,
Díaz LA, Beltrán MA, et al.

En el marco del XLVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas “Biología Sistémica Integración del
Conocimiento Biológico” que se realizó en la ciudad de Santiago de Cali del 9 de al 13 Octubre del 2012
presentaron la ponencia NIVELES SÉRICOS DE APOLIPOPROTEÍNA E ASOCIADOS A PREECLAMPSIA EN POBLACIÓN COLOMBIANA.

 Felipe Garcia Vallejo. Presidente Junta Directiva Nacional	 Leonidas Zambrano Polanco. Secretario Junta Directiva Nacional	 Jose Maria Satizabal Soto. Presidente 47 Congreso Nacional Ciencias Biológicas
---	---	--

			
--	---	---	---

ANEXO N. CERTIFICADO CONGRESO. ASOCIACIÓN ENTRE FRACCIONES LIPIDICAS Y PRE-ECLAMPSIA



EL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA

CERTIFICA QUE

*El trabajo de investigación
"ASOCIACIÓN ENTRE FRACCIONES LIPÍDICAS Y PRE-ECLAMPSIA".*

Cuyos autores son:

Serrano Norma, Díaz Luis, Guío Elizabeth, Páez María Carolina, Colmenares Claudia, Mantilla Gerardo, Bautista Paula

Participó en la modalidad de Poster, en el 12º CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA CNB-COLOMBIA, realizado en el Centro de Eventos Valle del Pacífico de la ciudad de Cali durante los días 2, 3 y 4 de noviembre de 2012.

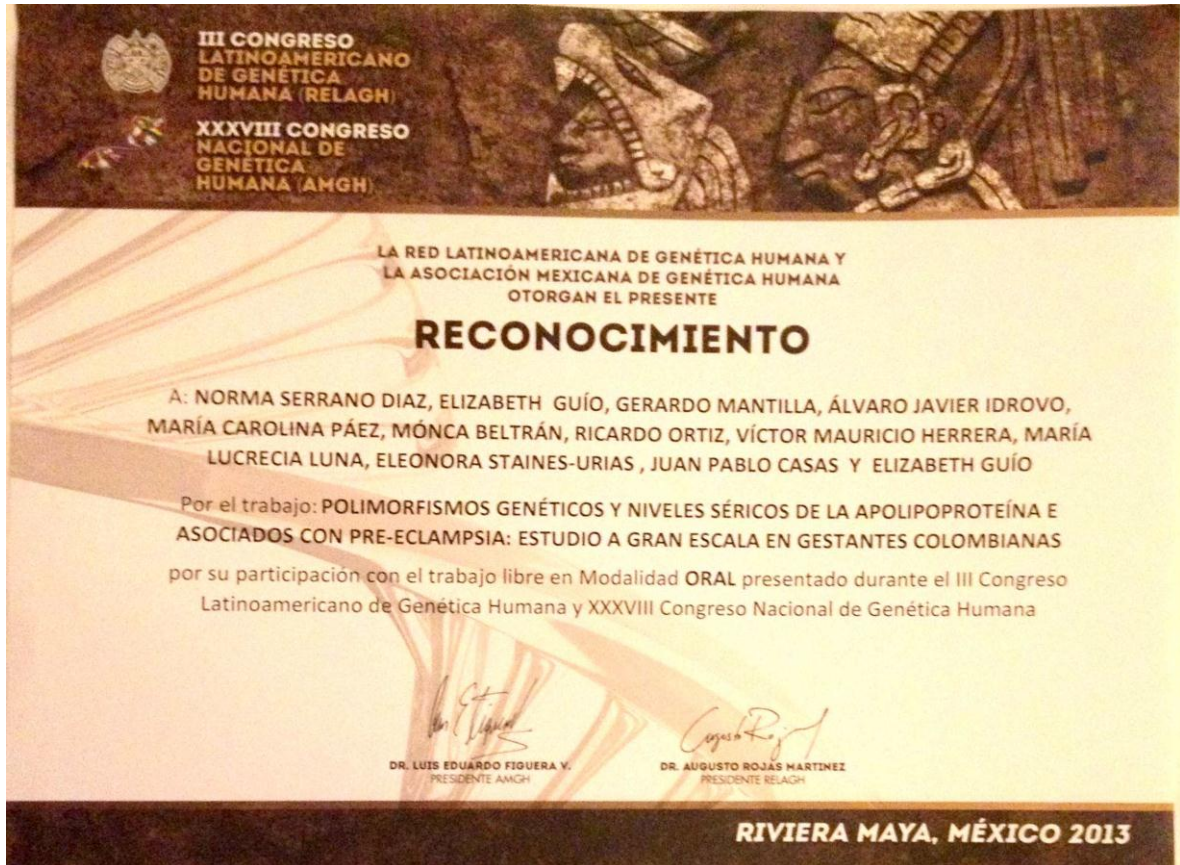
Cali, 4 de noviembre de 2012

Stella P de Bolívar
STELLA PÁEZ DE BOLIVAR
Presidenta CNB – COLOMBIA

María Eugenia González
MARÍA EUGENIA GONZALEZ RODRIGUEZ
Presidenta Congreso CNB-COLOMBIA

Claudia Lucía Villegas G.
Coordinadora Comité Académico
12º Congreso CNB-COLOMBIA

ANEXO O. CERTIFICADO CONGRESO. NIVELES SÉRICOS DE SPOLIPOPROTEÍNAS ASOCIADAS A PRE-ECLAMPSIA



ANEXO P. CERTIFICADO CONGRESO. POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y NIVELES SÉRICOS DE APOE



LA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE ENDOCRINOLOGÍA, DIABETES Y METABOLISMO, ACE.
NIT 860.023.047 – 5

CERTIFICA QUE:

El trabajo de investigación “NIVELES SÉRICOS DE APOLIPOPROTEÍNAS ASOCIADOS A PRE-ECLAMPSIA”, se presentó para Concurso de Investigación Clínica en la modalidad de Poster, en el marco del 12 Congreso Colombiano de Endocrinología, Diabetes y Metabolismo, el cual se celebrará del 30 de Mayo al 2 de Junio de 2013, en el Hotel Intercontinental de Medellín.

Este trabajo se presentó por los siguientes autores:

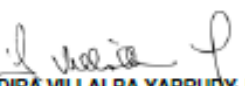
Autor Principal:

Serrano NC1,2, Páez MC1, Mantilla G1,3, Díaz LA1,3, Ortiz R1, Beltrán M1, Mesa CM4, Sanín JE5, Monsalve G6, Saldarriaga W7, Monterrosa A8, Guío E1.

La presente certificación se expide a solicitud del interesado.

Bogotá, 20 de Junio de 2013

Cordialmente,


YADIRÁ VILLALBA YABRUDY, MD
Presidenta
ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE ENDOCRINOLOGÍA, DIABETES Y METABOLISMO


ESDRAS MARTÍN VÁSQUEZ MEJÍA, MD
Presidente
12 CONGRESO COLOMBIANO DE ENDOCRINOLOGÍA

Asociación Colombiana de Endocrinología, Diabetes y Metabolismo
Carrera 15 No. 98-42 Of. 303. Tel. (0057-1) 6420243 / 6420245, Bogotá, Colombia. Suramérica.
Línea Gratuita Nacional 018000 110 113 www.endocrino.org.co – comunicaciones@endocrino.org.co

ANEXO Q. CERTIFICADO CONGRESO. ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y NIVELES DE APOLIPOPROTEINA E Y PRE-ECLAMPSIA EN GESTANTES COLOMBIANAS



**XIII CONGRESO COLOMBIANO
DE GENÉTICA HUMANA
VII CONGRESO INTERNACIONAL**

*Premio a la Investigación en Genética Humana
ACGH- Tecnoquímicas*

Al trabajo

**ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS Y NIVELES DE APOLIPOPROTEÍNA E
Y PREECLAMPSIA EN GESTANTES COLOMBIANAS**

Norma Serrano Díaz, Universidad Autónoma de Bucaramanga – Gerardo Mantilla Mora, Universidad Industrial de Santander
Elizabeth Guío Mahecha, Universidad Autónoma de Bucaramanga - María Carolina Paez Leal, Universidad Autónoma
de Bucaramanga - Mónica Andrea Beltrán Avendaño, Universidad Autónoma de Bucaramanga - Ricardo Ortíz Serrano, Universidad
Autónoma de Bucaramanga - Víctor Mauricio Herrera Gallindo, Universidad Autónoma de Bucaramanga - María Lucrecia Luna
González, Universidad Autónoma de Bucaramanga - Eleonora Staines Urias, London School of Hygiene & Tropical Medicine
Juan Pablo Casas, London School of Hygiene & Tropical Medicine

Reconocimiento otorgado por el
**Comité Organizador del XIII Congreso Colombiano de Genética Humana
y VII Congreso Internacional de Genética Humana**



HARRY PACHAJOA
Presidente Congreso Colombiano de Genética Humana

Universidad Icesi, 3 al 5 de septiembre de 2014
Santiago de Cali, Colombia

Santiago de Cali, 5 de septiembre de 2014



ANEXO R. CERTIFICADO DE PASANTÍA



Universidad de Salamanca-CSC



Campus Unamuno S/n
37007, Salamanca, España
Tel. 923 29 47 20
Fax. 923 29 47 43
E-mail: cicancer@usal.es

D. JOSE MARIA SAYAGUES MANZANO, Investigador del Sistema Nacional de Salud, adscrito al Servicio de Citometría de la Universidad de Salamanca (España).

CERTIFICA QUE: la Dra. Elizabeth Guio Mahecha del Laboratorio de Genómica y Metabolismo de la Fundación Cardiovascular de Colombia (Floridablanca, Santander, Colombia), ha realizado una estancia de un mes (21 de Octubre - 21 de Noviembre 2014) en el Servicio General de Citometría de la Universidad de Salamanca, España. Durante este período ha profundizado en el conocimiento de técnicas de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) en tejidos frescos y parafinados para el diagnóstico genético de tumores sólidos y hemopatías malignas. Además, durante su estancia adquirió conocimientos en biología molecular que incluían extracción ADN y ARN, síntesis de cDNA, ejecución de PCR y RT-PCR y técnicas de secuenciación. En todo momento demostró poseer destreza técnica y manual y capacidad intelectual siendo óptimo el aprovechamiento durante este periodo.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado en Salamanca a 21 de noviembre de 2014.

Fdo. Dr. José María Sayagués Ph.D
Centro de Investigación del Cáncer
Av/ Universidad de Coimbra s/n
37007 Salamanca, España

**ANEXO S. BIOMARCADORES ASOCIADOS A RIESGO DE SINDROME
METABÓLICO: ESTUDIO EN PERSONAL MÉDICO Y ADMINISTRATIVO DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNAB**

ANEXO T. SERUM CONCENTRATIONS OF ANGIOGENIC FACTORS AS PREDICTORS OF SEVERITY OF PREECLAMPSIA IN COLOMBIAN POPULATION.

ANEXO U. ARTÍCULOS. VARIABLES PRE-ANALÍTICAS QUE AFECTAN LA CUANTIFICACIÓN SÉRICA DE PROTEÍNA C REACTIVA E IL-6 EN PRIMIGESTANTES PREECLÁMPTICAS Y CONTROLES SANOS