

Genotipificación de la apolipoproteína E en individuos de la población mexicana con demencia tipo Alzheimer

M. en C. Jesús Gabriel Silva-Escobedo,* Dr. Jaime Berumen-Campos,**
Dr. Ramón Arturo Valdés-Espinosa,* Dra. Maricela Olivia Franco-Lira,***
M. en C. Juan Javier Siller-Leyva,* Psic. Joel Moguel-Mondragón,****
Quim. Biol. Abigaíl Martínez-Parra,*** Dra. Teresa Hernández-Gutiérrez,***
Dr. Jorge Islas Marroquín*****

* Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

** Hospital Central Militar. *** Escuela Médico Militar.

**** Psicólogo clínico, miembro del Proyecto en Enfermedades Neurodegenerativas y Demenciales.

***** Jefe del Proyecto de Investigación de Enfermedades Neurodegenerativas y Demenciales.

Escuela Militar de Graduados de Sanidad-Unidad de Especialidades Médicas. México, D.F.

RESUMEN

Antecedentes. Diversos factores genéticos de susceptibilidad a la demencia tipo Alzheimer (DTA) han sido propuestos, siendo el más estudiado el polimorfismo del gen de la Apolipoproteína E (ApoE).

Objetivo. En el presente estudio se evaluó la frecuencia de los alelos de ApoE, se estableció si la genotipificación de ApoE es un elemento diagnóstico asociado con el estrés oxidativo y la DTA.

Método. Estudio prospectivo comparativo abierto en el cual se realizó la genotipificación de 72 individuos (36 del grupo control y 36 con DTA). Los pacientes fueron captados por los Servicios de Geriátrica y Neurología del Hospital Central Militar y la Unidad de Especialidades Médicas.

Resultados. El alelo más común en la población total fue E3 con 98% en sus formas homocigota y heterocigota, E4 con 23.6% y E2 con 4.1%. Dentro del grupo control el alelo predominante fue E3E3 (80%), E3E4 (16.6%) y sólo un caso con el genotipo de alto riesgo E4E4 (2.7%). Para el grupo con DTA el genotipo predominante fue E3E3 representando 63.8%, seguido por E3E4 (27.7%) y E2E3 (8.3%).

Se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.001$) en cuanto a la edad y el sexo entre el grupo control y el grupo con DTA. En cuanto a la frecuencia de los alelos y genotipos en ambos grupos no existen diferencias estadísticamente significativas.

Conclusiones. Los hallazgos sugieren que factores diferentes al genotipo pueden influir sobre la presentación de la enfermedad y estos factores podrían condicionar diferencias en el grado de estrés oxidativo presente

Apolipoprotein E genotyping in Mexican people subjects with Alzheimer disease

ABSTRACT

Background. Diverse genetic factors of susceptibility to the Alzheimer Disease (AD) has been proposed. The more studied has been the polymorphism of Apolipoprotein E gene (ApoE).

Objective. To evaluate the alleles frequency of ApoE, in a Mexican population. We settled down if the genotyping of ApoE is a diagnosis element associated with the oxidative stress and AD.

Method. We were carried out the genotyping of ApoE in 72 individuals (36 of the control group and 36 with AD).

Patients were recruited from the Geriatric and Neurologic services at the Military Central Hospital and the Specialty Medical Unit.

Results. The more common allele in the total population was E3 with a 98% in their homocygote and heterocygote forms, E4 with a 23.6 and E2 with a 4.1% frequency. In the control group the predominant genotype was E3E3 (80%), followed by E3E4 (16.6%) and just one person had the high risk genotype E4E4 (2.7%). In the AD group the predominant genotype was E3E3 representing 63.8%, followed by E3E4 (27.7%) and E2E3 (8.3%).

Conclusions. It was meaningful statistic differences ($p > 0.001$) for age and sex between the control group and the group with AD. For alleles and genotypes frequency in both groups they were not significant statistic differences. These findings suggest that another different factors besides the genotype, are able to influence AD presenta-

en los pacientes con demencia tipo Alzheimer y el grado de estrés oxidativo en aquellas personas que cursan con un envejecimiento exitoso.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, estrés oxidativo, genotipificación.

INTRODUCCIÓN

En 1907, el psiquiatra alemán Alois Alzheimer describió las características clínicas y patológicas encontradas en una mujer de 51 años de edad que cursaba con una demencia de más de cuatro años de evolución, la cual subsecuentemente llegó a ser reconocida como el padecimiento que ahora lleva su nombre.¹

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la más común de las enfermedades neurodegenerativas y está asociada con un patrón específico de cambios patológicos en el cerebro, lo cual resulta en la neurodegeneración y el desarrollo progresivo de la demencia.²

La principal característica de la EA es la degeneración neuronal asociada a las placas seniles compuestas por depósitos de la proteína β amiloide y neuritas distróficas asociadas con las marañas neurofibrilares (constituidas por la proteína tau) dentro del cuerpo de la célula nerviosa.³

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa del deterioro intelectual severo. Es una condición relacionada con la edad, afectando al 11% de la población mayor de 65 años y al 50% de los individuos mayores de 85, considerado como un desorden cerebral crónico, esta enfermedad presenta una fase preclínica prolongada seguida por un estado patológico progresivo asociado con la neurodegeneración.^{4,5}

tion, and such factors could cause differences in the oxidative level of stress in AD patients as well as individuals with a successful ageing.

Key words: Alzheimer disease, oxidative stress, genotyping.

Esta enfermedad es un grave problema de salud, económico y social para muchos países. Actualmente se estima que en el mundo existen más de 20 millones de personas con EA. Con el aumento de la población y el envejecimiento de los individuos, esta cifra pudiera triplicarse para el año 2040 de no contarse con el conocimiento y entendimiento de los factores fisiológicos, epidemiológicos y moleculares involucrados en esta enfermedad.⁶

Actualmente no existen marcadores biológicos o características clínicas que permitan realizar con exactitud un diagnóstico bien definido de la EA.

En los últimos años, diversos factores genéticos de susceptibilidad del Alzheimer han sido propuestos. Uno de los más documentados es el polimorfismo del gen de la apolipoproteína E (ApoE).

Esta apolipoproteína de 299 aminoácidos, desempeña un papel muy importante en la regulación del metabolismo del colesterol y los triglicéridos.

Está codificada por el gen (ApoE) localizado en el cromosoma 19 y existe como tres alelos, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ (Figura 1).

Los sujetos que expresan el alelo $\epsilon 4$ presentan elevados niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y colesterol total comparados con individuos con el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$.⁷

En 1993, Strittmatter y cols. encontraron que el alelo ApoE $\epsilon 4$ está asociado con un riesgo elevado de desarrollo de la EA de inicio tardío. El riesgo asociado con el alelo ApoE $\epsilon 4$ en población caucásica es de 12.4 para sujetos homocigotos y 2.7 para sujetos heterocigotos, lo cual sugiere un efecto de dosis del gen.⁸

Un interrogante importante es saber si la edad de inicio de la enfermedad está en función de la presencia de los diferentes genotipos de ApoE.

En los Estados Unidos sólo 2% de la población enferma está relacionada al genotipo ApoE $\epsilon 4/\epsilon 4$, mientras que 81% presentan el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ o $\epsilon 3/\epsilon 3$, el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ en menos del 1% de la población. De manera general el gen E4 en sus diferentes versiones se encuentra entre 21 y el 28% de la población de individuos con Alzheimer. Se ha determinado que en población caucásica la frecuencia de ApoE2 es de 3.7%, para el caso de ApoE3 presenta un porcentaje de 75% y el alelo E4 una incidencia de 10 a 15%.^{9,10}

En un estudio con pacientes colombianos Arboleda y cols. encontraron una incidencia total de E4 de

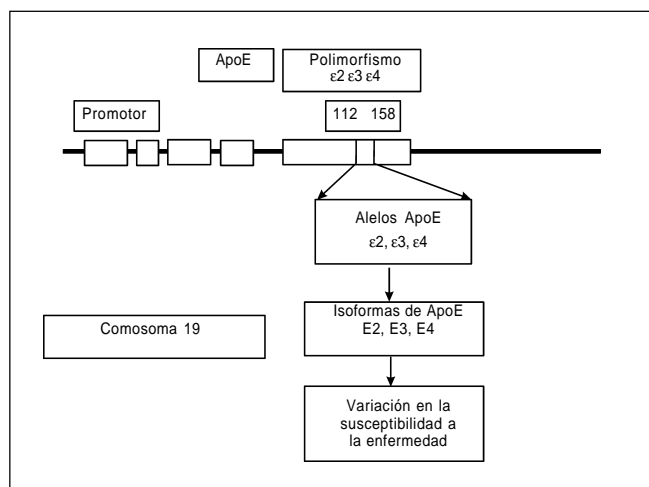


Figura 1. Representación del gen de la apolipoproteína E y los diferentes alelos, donde se muestra la localización del gen de ApoE y sus diferentes alelos.

37.2% y para individuos los controles de 5.8% y para al menos un caso de ApoE2 una frecuencia de 2%.

Para las frecuencias genotípicas se encontró que difieren en los dos grupos donde el genotipo más común fue E3/E3, pero con frecuencias de los genotipos 3/4 y 4/4 mayores en los pacientes con demencia tipo Alzheimer.¹¹

Por su parte, Duarte reporta que los alelos E2, E3, E4 de ApoE son los más comunes en la población general los cuales determinan seis genotipos diferentes, siendo el más común de ellos el genotipo E3/E3 con 60% de incidencia.¹²

Caselli y cols. estudiaron 80 individuos asintomáticos que presentaban pérdida de memoria relacionado con la edad mismos que se les realizó la genotipificación de ApoE para establecer la asociación con el decline de la memoria. Se encontró que 75% de individuos fueron homocigotos para E4/E4, 20 heterocigotos para E3/E4.¹³

En otro trabajo de Andrade y cols. realizaron un estudio donde se asoció el polimorfismo de la apolipoproteína con los niveles de lípidos en individuos con EA. Estudiaron 448 individuos caucásicos no relacionados, entre los cuales había 20 individuos con EA y 100 afrobrasileños con este padecimiento.¹⁴

Debido a que se ha observado que las pruebas clínicas combinadas con los estudios postmortem indican que el diagnóstico de la enfermedad es incorrecto en el 5-35% de los casos, se hace necesaria una prueba detectora que ayude a resolver y establecer un diagnóstico más preciso, reducir costos y proveer información potencialmente útil para determinar las estrategias terapéuticas más adecuadas para el tratamiento de esta enfermedad.

Este estudio pretende evaluar inicialmente la frecuencia y/o prevalencia de los alelos de ApoE en individuos con diagnóstico clínico de demencia tipo Alzheimer y establecer desde el punto de vista clínico si la genotipificación de ApoE es un elemento diagnóstico predictivo asociado con el estrés oxidativo y con la DTA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos de estudio

Los pacientes con demencia tipo Alzheimer (n = 36) y del grupo control (n = 36) con edades entre 60 y 95 años, fueron captados por los servicios de Geriatria y Neurología del Hospital Central Militar y la Unidad de Especialidades Médicas. El diagnóstico de probable DTA fue hecho con base en los resultados de la batería de pruebas para la evaluación del estado mental (Minimental test, Prueba de Activa-

ción Neurolingüística, Escala de Depresión de Hamilton, y prueba de riesgo vascular de Hashinski) y por la realización de estudios de gabinete como Electroencefalograma Digital, Tomografía Axial Computarizada y Tomografía Cerebral por Resonancia Magnética.

La participación de los individuos en el estudio se logró previa firma de cartas de consentimiento informado por los pacientes y/o sus familiares.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se tomaron muestras de sangre periférica de cada uno de los individuos en tubos vacutainer con EDTA (Becton Dickinson). La muestra fue fraccionada por centrifugación (1,500 rpm por cinco minutos), los leucocitos fueron separados y almacenados a -20 °C para posteriormente realizar la extracción de ADN.

Extracción de ADN y genotipificación del gen de ApoE

El ADN de las células fue extraído por el método de fenol-cloroformo para leucocitos de sangre periférica obteniendo el material genético íntegro y de bue-

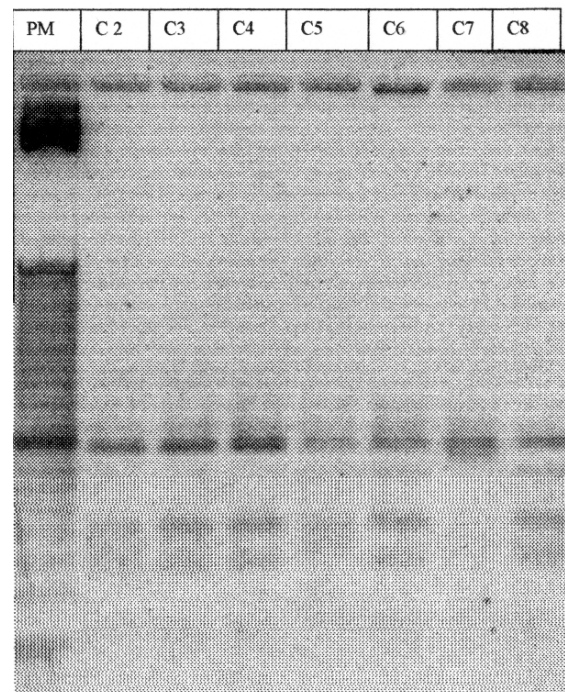


Figura 2. Genotipificación de APOE. Fotografía de un gel de agarosa 1000 al 3.5% donde se muestra el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción por la técnica de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular de 10 pb. Carriles 2 al 4 genotipificación de ApoE en muestras de pacientes con demencia tipo Alzheimer (DTA). Carril 2: E3/E3. Carril 3: E3/E3. Carril 4: E3/E3. Carril 5: E3/E3. Carril 6: E3/E4. Carril 7: E2/E3. Carril 8: E3/E4. Analizados de izquierda a derecha.

na calidad para el estudio en concentración promedio de 200 ng/mL siendo almacenado a 4 °C para su posterior análisis.

Tomando como base el método descrito por Dalling-Thie,¹⁵ el genotipo de ApoE fue determinado

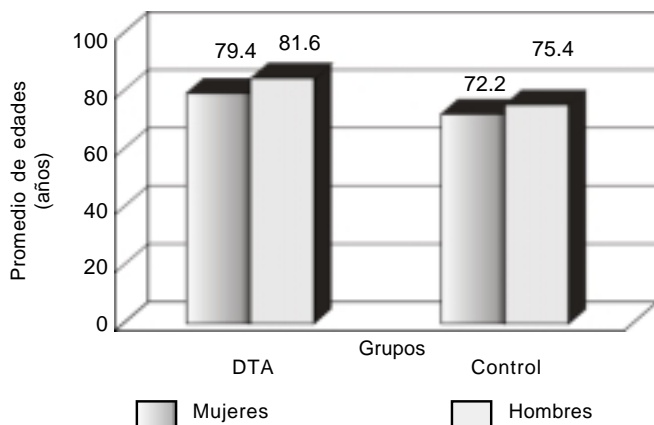


Figura 3. Distribución por edades de los individuos del grupo control y pacientes con demencia tipo Alzheimer, mostrando los promedios de edad de cada grupo.

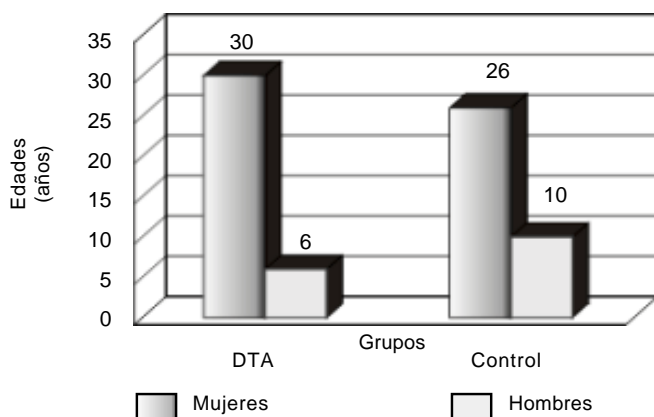


Figura 4. Distribución por sexos de los individuos del grupo control y pacientes con demencia tipo Alzheimer, mostrando la n para cada uno de los grupos.

mediante el empleo del método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción por reacción en cadena de la polimerasa empleando dos “primers” para la amplificación del amplicón de ApoE de 227 pb. Se realizó la digestión del amplificado con la enzima de restricción Cfol durante toda la noche a 37 °C y se corrió la muestra en un gel de agarosa 1,000 al 3%, empleando un marcador de peso molecular de 10 pb para obtener de esta forma el patrón diferencial de bandas y así establecer los genotipos presentes en cada individuo (Figura 2).

ESTADÍSTICA

El análisis de los datos de edad y sexo se empleó la prueba de Ji² y la prueba de T. Para analizar la frecuencia de los alelos de ApoE y la relación con la enfermedad de Alzheimer se realizó la prueba de Hardy-Weinberg y la prueba de Kruskal-Wallis.²

RESULTADOS

En el presente estudio se realizó la genotipificación alélica en 36 individuos con diagnóstico de DTA con base en todos los estudios clínicos arriba citados.

De los 36 pacientes con diagnóstico de demencia tipo Alzheimer, 30 fueron del sexo femenino y seis del sexo masculino. La edad promedio del grupo de mujeres fue de 79.4 años mientras que para el grupo de hombres la edad fue mayor, con una media de 81.16 años.

En cuanto al grupo control, éste estuvo constituido por 36 individuos, 26 del sexo femenino y 10 del sexo masculino, y los promedios de edad fueron de 72.2 y 75.4 años, respectivamente (Figuras 3 y 4).

En el cuadro 1 se muestran los resultados de la frecuencia de cada uno de los tres alelos de ApoE en sus diferentes versiones, es decir, en su forma homocigota o heterocigota para el total de individuos estudiados.

Cuadro 1. Frecuencias de los alelos de ApoE en individuos del grupo control y en pacientes con EA, mostrando la frecuencia genotípica para cada uno de los grupos de estudio.

	Genotipo	Individuos (n)	Frecuencia genotípica (%)	Alelo	Individuos (n)	Frecuencia alélica (%)
Grupo control	E2E3	0	-	E2	0	0
	E3E3	29	80.00	E3	35	97.20
	E3E4	6	16.66	E4	7	19.44
	E4E4	1	2.70			
Enfermos EA	E2E3	3	16.21	E2	3	8.33
	E3E3	29	59.40	E3	36	100
	E3E4	6	24.32	E4	10	27.70
	E4E4	0	0			

Cuadro 2. Frecuencias genotípicas y alélicas en el total de la población, se incluyen tanto los individuos con DTA como los controles.

Genotipo	Frecuencia genotípica (%) Población general* (n=72)	Alelo	Frecuencia alélica (%) Población general*(n=72)
E2E3	4.1% (n=3)	E2	4.1% (n=3)
E3E3	72.2% (n=52)	E3	98.6% (n=71)
E3E4	2.6% (n=16)	E4	23.6% (n=17)
E4E4	11.38% (n=1)		

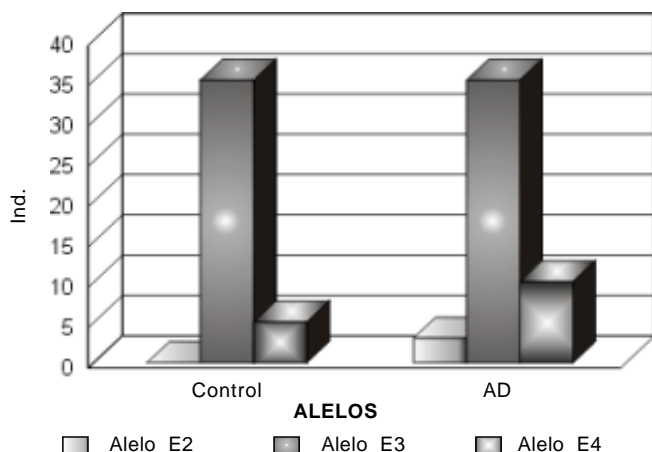


Figura 5. Frecuencia alélica de ApoE en individuos sanos e individuos con demencia tipo Alzheimer. Se observa que el alelo predominante en ambos grupos es E3 con una frecuencia de 97.2% (n = 35) para el grupo control y 100% (n = 36) para el grupo con demencia. Mientras que el alelo E2 presentó frecuencia de 8.33% (n = 3) en el grupo con DTA. El alelo E4 se presentó en 19.44% (n = 7) y 27.7% (n = 10) para el grupo control y DTA, respectivamente.

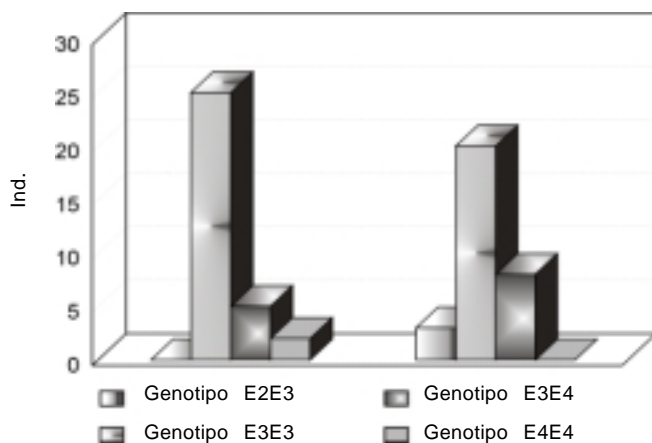


Figura 6. Frecuencia genotípica de ApoE en individuos normales y en el grupo con demencia tipo Alzheimer.

En cuanto a la frecuencia de alelos de ApoE se encontró que en los individuos del grupo control, 35 presentaron el alelo E3 en sus diferentes versiones (E3E3 y E3E4) esto representa una frecuencia de 97.2%. Por su parte, siete individuos presentaron el alelo 4 en una o dos copias correspondiendo al 19.44% de frecuencia alélica. En este grupo no se encontró el alelo E2 (Figura 5).

Para el grupo con demencia tipo Alzheimer se presentaron con una frecuencia de 8.33% (n = 3), para el alelo E2, 100% (n = 36) para el alelo E3 y 27.7% (n = 10) para el alelo E4, los tres en su forma tanto homocigota como heterocigota.

En cuanto a los genotipos, se encontró en el grupo control que 29 individuos presentaron el genotipo homocigoto para E3E3, seis el heterocigoto E3E4 y sólo una mujer presentó el genotipo homocigoto para E4 (E4/E4). De esta manera, la frecuencia genotípica fue de 80.33% para E3E3, 16.66% para E3E4 y de 2.7% para el caso homocigoto E4E4.

Por su parte, en el grupo de individuos con diagnóstico de DTA, la frecuencia genotípica fue de 8.33% para E2E3 (n = 3), para el genotipo E3E3 63.88% (n = 23) y 27.77% con 10 casos para el genotipo E3E4. Cabe mencionar que en este grupo con diagnóstico de demencia tipo Alzheimer, no se presentó el genotipo homocigoto E4E4 asociado con un alto riesgo para desarrollar Alzheimer (Cuadro 2, Figura 6).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Como en muchas de las enfermedades crónico-degenerativas, existe un proceso complejo y prolongado que da origen al desarrollo de la enfermedad como es el caso de la EA, múltiples factores o determinantes ambientales o genéticos interactúan para crear la susceptibilidad a esta enfermedad.

En el presente trabajo se estudió la frecuencia alélica y genotípica de la apolipoproteína E, la cual tiene una gran importancia en el sistema nervioso central, así como la relación a la asociación del alelo E4 con el incremento en el riesgo de desarrollar la EA en los casos de enfermedad de origen familiar o bien en los casos esporádicos de aparición tardía.

Las variantes polimórficas del gen de ApoE se han asociado también con la longevidad en la población humana (particularmente caucásica). Con alta frecuencia del alelo E2 en individuos con más de 90 años de edad, comparados con los alelos E3 y E4 que contrariamente se asocian con una selección negativa para la longevidad.

En relación con la frecuencia alélica en el total de la población analizada en nuestro grupo de estudio, se observa que las frecuencias encontradas para los

tres alelos de ApoE varían discretamente de las reportadas en otros trabajos, no obstante, tal como reportan otros investigadores, los alelos más comunes son el E3 seguido por el alelo E4, siendo E2 el alelo menos común.

En cuanto a la frecuencia de los genotipos en la población en general se encontró que el más común es E3/E3 (72.2%) comparado con 60% reportado por otros autores.

El genotipo E3E4 se presenta con la misma frecuencia reportada por otros autores encontrándose 22.2%.

Por su parte, el genotipo E4/E4 es el que presentó menor frecuencia (1.38%).

Las frecuencias tanto alélicas como genotípicas varían de lo reportado en otros estudios; consideramos que estas variaciones puedan ser originadas por las diferencias genéticas debidas a factores raciales y geográficos que pudieran estar influyendo de manera importante sobre la frecuencia de determinado alelo y por ende en la frecuencia de un genotipo determinado.

Estas mismas frecuencias alélicas y genotípicas encontradas en nuestro grupo de estudio permiten considerar que nuestros pacientes configuran un grupo *sui generis* en relación con otros reportados en la literatura. La principal característica es la alta incidencia del alelo E3, la relativa baja incidencia del alelo E2, y especialmente la notable baja incidencia del alelo E4 en individuos del grupo control. Este último hallazgo nos permite concluir que los casos encontrados en este estudio pertenecen a los conocidos como de DTA esporádica, en donde ya algunos autores mencionan que el alelo E4 de la ApoE tiene influencia relativamente baja en la génesis de la DTA.

No obstante lo anterior, creemos que nuestros hallazgos son interesantes, puesto que hay claras diferencias entre las frecuencias de los genotipos del grupo de pacientes con DTA y el grupo control, y estas diferencias muy probablemente pueden estar condicionando diverso grado de estrés oxidativo o diferente manera de enfrentarlo, a través del metabolismo de las lipoproteínas séricas entre los sujetos que tienen DTA y aquellos que cursan con un envejecimiento exitoso.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo forma parte del Proyecto Multidisciplinario de Investigación de Enfermedades

Neurodegenerativas y Demenciales el cual es apoyado con fondos de CONACyT. Convenio M-45390.

Agradecemos al Dr. Francisco Campos, del Servicio de Geriatria de la Unidad de Especialidades Médicas, por su apoyo en la captación de los pacientes.

Los autores agradecen cumplidamente a cada uno de los pacientes y familiares, así como a las personas que integraron el grupo control por su valiosa cooperación para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Markesbery RW. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer Disease. *Free Radicals Biology and Medicine* 1997; 23(1): 134-47.
2. Evans DA, Funkenstein HH, Alberts MS, et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older person. *JAMA* 1989; 262: 2551-66.
3. Miranda S, Opazo C, Larrondo FL. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 2000; 62: 633-48.
4. Katzman R, Kawas CH. The epidemiology of dementia and Alzheimer's disease. In: Terry RD, Katzman R, Bick KL (Eds). *Alzheimer's disease*. New York: Raven Press; 1994, p. 105-22.
5. Hof PR, Kopoulos PG, Vickers JC, Bouras C, Morrison J. The morphologic and neurochemical basis of dementia: Aging. Hierarchical patterns of lesion distribution and vulnerable neuronal phenotype. *Rev Neurosci* 1994; 6: 97-124.
6. Silva E.J.G. Papel del estrés oxidativo en la patogénesis de la demencia tipo Alzheimer. *Revista del Ejército y Fuerza Aérea*, 2001; Nov: 33-8.
7. Florence R, Amouyel P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharm* 2001; 412: 1-12.
8. Strittmatter WJ, Saunders AM, Smechel D, Pericak M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: High avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 90: 1977-81.
9. Giacobini E. Closer to the truth about ApoE-4. *Alzheimer Insights* 1996; 2(2).
10. Growdon JH. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Archives Neurol* 1998; 55(8): 1053-7.
11. Arboleda G, Arboleda H, Yunis JJ, Parco R, Gómez CH. Genotipificación de la apolipoproteína E en una muestra de pacientes colombianos con enfermedad de Alzheimer. III Encuentro Latinoamericano y Caribeño de Asociaciones de Alzheimer, Cuba, 1999.
12. Duarte D, Mato J, Lilibre J de J, Prendes N. Caracterización genotípica de la ApoE en familias cubanas con enfermedad de Alzheimer. III Encuentro Latinoamericano y Caribeño de Asociaciones de Alzheimer, Cuba, 1999.
13. Caselli JR, Casell R, Osborne D, Relman ME, et al. Preclinical cognitive decline in late middle-aged asymptomatic apolipoprotein E-e4/4 homocytotes: A replication study. *J of Neurological Science* 2001; 89(1-2): 93-8.
14. De Andrade FM, Larrandaburu M, Callegary-Jaques SM, Gastaldo G, Hertz MH. Association of apolipoprotein E polymorphism whit plasma lipids and Alzheimer disease in a southern brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33: 529-37.
15. Dalling-Thie MG, Trip Van Linde-Sibenius M, Kock WA, De Bruin AWT. Apolipoprotein E2/E3/3/E4 genotyping with agarose gels. *Clin Chem* 1995; 41(1): 73-5.

Recibido: Mayo 14, 2002.
Aceptado: Junio 18, 2002.