

Anàlisi de polimorfismes en el gen APOE en una població de malalts d'Alzheimer de Mallorca.

Antoni Gayà¹, Anna Espino², Silvia Calleja¹, Jordi Ballabriga², Javier Calvo¹

Resum

Objectiu: Verificar l'associació entre l'al·lel APOE4, el polimorfisme del promotor APOE -491 T/A i el desenvolupament de malaltia d'Alzheimer.

Pacients i mètodes: S'analitza el genotip APOE i el genotip del polimorfisme -491 T/A del promotor del gen APOE mitjançant PCR seguida de digestió amb un enzim de restricció, en 34 pacients de Mallorca afectats de probable Malaltia d'Alzheimer i en 57 controls sans.

Resultats: A la nostra població, la freqüència de l'al·lel APOE4 va ser significativament superior en els pacients respecte dels controls ($p=0,02$; OR: 2,55). També la freqüència del genotip -491 AA mostrà una diferència estadísticament significativa respecte de la població control ($p=0,026$; OR: 3,5). Quan es va analitzar la presència conjunta d'ambdós polimorfismes es comprovà com la possessió de l'al·lel APOE4 en un context d'alt nivell de producció de la proteïna ApoE, tal com ve determinat pel polimorfisme -491 AA, s'associa al major risc de desenvolupar la malaltia d'Alzheimer ($p=0,0039$; OR:4.73).

Conclusions: Tant l'al·lel APOE-4 com el polimorfisme -491 A i molt més la seva presència conjunta constitueixen un factor important en el desenvolupament de malaltia d'Alzheimer.

Paraules clau: Malaltia d'Alzheimer, APOE, promotor APOE, polimorfismes, genètica.

Introducció

La malaltia d'Alzheimer és la forma més freqüent de demència degenerativa del sistema nerviós central i afecta principalment a persones d'edat avançada. Es defineix, des del punt de vista clínic, com un dete-

riorament lent i progressiu de les funcions cognitives, que s'inicia de forma habitual amb pèrdues de memòria provocant amb l'evolució greus repercussions en la vida social i laboral. Les principals trobades neuropatològiques d'aquesta malaltia inclouen dipòsits d'amiloide, cabdells neurofibril·lars, gliosis astrocítica i reducció en el nombre de neurones i sinapsis en moltes àrees del cervell, especialment del còrtex cerebral i de l'hipocamp¹.

L'etiologia de la malaltia d'Alzheimer és complexa. A partir dels nombrosos estudis epidemiològics s'han proposat una sèrie de factors de risc potencials: factors ambientals (traumes cranials, tabaquisme i exposició a metalls pesats), sociològics (depressió, nivell d'educació), biològics (edat avançada, hipertiroïdisme, edat materna avançada) i història familiar (síndrome de Down i malaltia d'Alzheimer). De tots aquests estudis es pot concloure que, apart de la longevitat, l'història familiar és el principal factor de risc en la malaltia d'Alzheimer. El fet de tenir un familiar de primer grau amb la malaltia determina un risc relatiu de patir la malaltia d'Alzheimer d'entre 2² i 3.5³, a la vegada que la edat d'inici sembla mantenir-se constant en el si d'una família². Aquest fet s'ha confirmat en estudis amb germans bessons⁴. Per tot això, s'ha suggerit que alguns factors genètics podrien jugar un paper determinant en aquesta malaltia.

Es possible classificar els pacients afectats de malaltia d'Alzheimer en funció de l'edat d'inici i del tipus d'herència. La malaltia d'inici precoç o presenil es defineix com la que apareix abans del 65 anys, essent la majoria d'aquests casos familiars, amb un patró d'herència autosòmica dominant. Aquest tipus de malaltia d'Alzheimer és poc freqüent constituint tan sols un 1% del total de casos⁵. Mitjançant l'estudi de grans famílies multigeneracionals s'han identificat tres gens que, en conjunt, serien responsables de la meitat dels casos de malaltia d'Alzheimer de inici precoç: el gen APP (precursor de la proteïna amiloide) i els gens de les Presenilines (PS1 i PS2).

El primer gen que es va associar amb la malaltia d'Alzheimer d'inici precoç va ser el gen de la proteïna precursora d'amiloide (APP)^{6,7}, degut al seu paper

¹Laboratori de Biologia Molecular, Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears; ² Unitat de Neurologia, F. Hospital Son Llatzer

Direcció per a correspondència: Dr. A. Gayà. Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears. Rosselló i Caçador 20. 07004 Palma.

en la formació de les plaques senils que es troben en els cervells dels pacients de malaltia d'Alzheimer. S'han identificat sis diferents mutacions patogèniques, totes elles totalment penetrants, es a dir que tots aquells individus que són portadors de la mutació desenvolupen invariablement la malaltia⁸. Aquestes mutacions tan sols s'han detectat en unes 20 famílies d'arreu del món.

Respecte a les mutacions en els gens PS1 i PS2⁸ s'han descrit fins a 45 mutacions en el gen PS1 i tan sols dos en el gen PS2, essent pràcticament totes elles totalment penetrants. De totes aquestes mutacions, 35 s'han trobat en pacients individuals o en un sol parent, per la qual cosa es considera que el 70% de les mutacions de les presenilines identificades fins ara son genèticament "privades"⁸. Aquest fet determina que l'estudi de les mutacions conegudes en nous malalts o famílies afectes de la malaltia d'Alzheimer ha de donar un resultat negatiu encara que efectivament siguin portadors d'una mutació en aquest gen. Aquesta consideració també s'aplica a les mutacions en el gen APP que son encara mes poc freqüent. En ambdós casos tan sols la seqüenciació dels gens podria evidenciar l'existència d'una mutació.

La major part dels malalts d'Alzheimer són però d'inici tardà per damunt dels 65 anys. En aquesta forma no es registra una història familiar notòria pel qual es considera d'aparició esporàdica i sorgiria com a resultat de la combinació de factors ambientals i factors genètics no dominants. Aquests factors genètics inclouen entre d'altres els següents gens: Apolipoproteïna E (APOE), Receptor de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL-R), α 2-macroglobulina (A2M), preselinina 2 (PS2), butirilcolinesterasa (BChE), α 1 antiqumiotripsina (ACT) i proteïna LDL-relacionada (LRP)⁹. De totes aquestes associacions amb la que realment s'ha observat un lligam mes estret ha estat amb el gen APOE. Aquest gen es localitza al cromosoma 19q13 i codifica la apolipoproteïna E (ApoE) que es la apolipoproteïna amb major nivell d'expressió del sistema nerviós central. Aquesta proteïna juga un paper important en el metabolisme de les proteïnes riques en triglicèrids i en la regulació del colesterol. A més, s'ha suggerit que també participa en la reparació, creixement i manteniment de la mielina i de les membranes axonals. El gen APOE té tres al·lels comuns: E2, E3 i E4, que determinen substitucions aminoacídiques (Arginina i Cisteïna) a les posicions 112 i 158 de la proteïna. El polimorfisme APOE4 s'ha associat amb un risc augmentat i una menor edat a l'inici de la malaltia tant per a la forma familiar com per a l'esporàdica¹⁰⁻¹². L'al·lel APOE4 sembla actuar fonamentalment com

un modificador de l'edat d'inici en el individu que per altre part serien susceptibles a desenvolupar malaltia d'Alzheimer, d'acord amb la seva documentada interacció amb l'APP13 i amb la diferència d'entre 5 i 7 anys en l'edat d'inici que s'observa entre les parelles de germans que discrepen en el seu status d'APOE-4/4¹⁴. D'acord amb aixó, s'ha observat que l'al·lel APOE4 disminueix l'edat d'inici i augmenta el dipòsit d'amiloide en els pacients que presenten mutacions en el gen APP¹³. En aquest cas no sembla que l'al·lel APOE afecti el desenvolupament de la malaltia¹⁵.

D'altra banda, l'al·lel APOE2 sembla proporcionar protecció en front de la malaltia^{16, 17}. Encara que l'al·lel APOE4 te un impacte significatiu respecte del risc de desenvolupar malaltia d'Alzheimer, molts pacients afectats de malaltia d'Alzheimer no presenten aquest al·lel i molts individus que hereten l'al·lel e4 es mantenen cognitivament normals passats el 90 anys d'edat¹⁷. Per tant es possible que d'altres factors genètics o ambientals modifiquin el risc de desenvolupar malaltia d'Alzheimer.

L'observació d'una distorsió en la expressió al·lèlica del gen APOE va suggerir que a mes d'un efecte de funcionalitat o qualitatiu del polimorfisme APOE en l'aparició de la malaltia d'Alzheimer, els nivells d'expressió quantitativa d'aquests al·lels poden ser també un factor clau¹⁸. Aquesta hipòtesi es va veure reforçada pel descobriment de variants polimòrfiques en el promotor del gen APOE que tenen un efecte modulador en el risc de desenvolupar la malaltia^{19, 20}. Posteriorment, es va poder confirmar l'associació entre els polimorfismes del promotor APOE i el risc de malaltia d'Alzheimer. A més, i a pesar del fort desequilibri de lligament existent¹⁹, es va comprovar que aquesta associació era independent del risc depenent de l'al·lel APOE4.

Al present estudi ens proposem verificar l'associació entre l'al·lel APOE4, el polimorfisme del promotor APOE -491 T/A i el desenvolupament de malaltia d'Alzheimer en 34 pacients de Mallorca afectats de probable malaltia d'Alzheimer i en 57 controls sans.

Pacients i mètodes

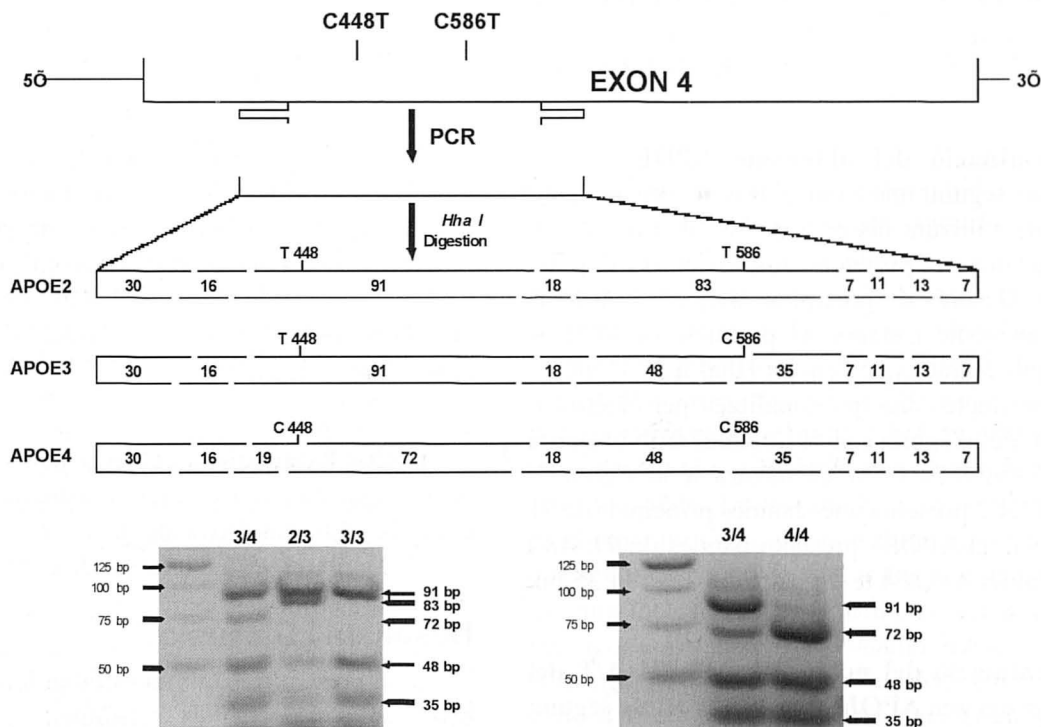
Pacients: Es va obtenir una mostra de sang perifèrica de 34 pacients que complien criteris NINCDS-ADRDA²¹ de Probable Malaltia d'Alzheimer en la seva forma senil i esporàdica. Es tractava de pacients, no estudiats prèviament, que procedien de la Unitat de Neurologia de l'Hospital Son Llàtzer. El diagnòstic s'havia establert després del protocol d'estudi clínic habitual d'aquesta patologia que inclou avaluació

neurològica, neuropsicològica, proves de laboratori i de neuroimatge.

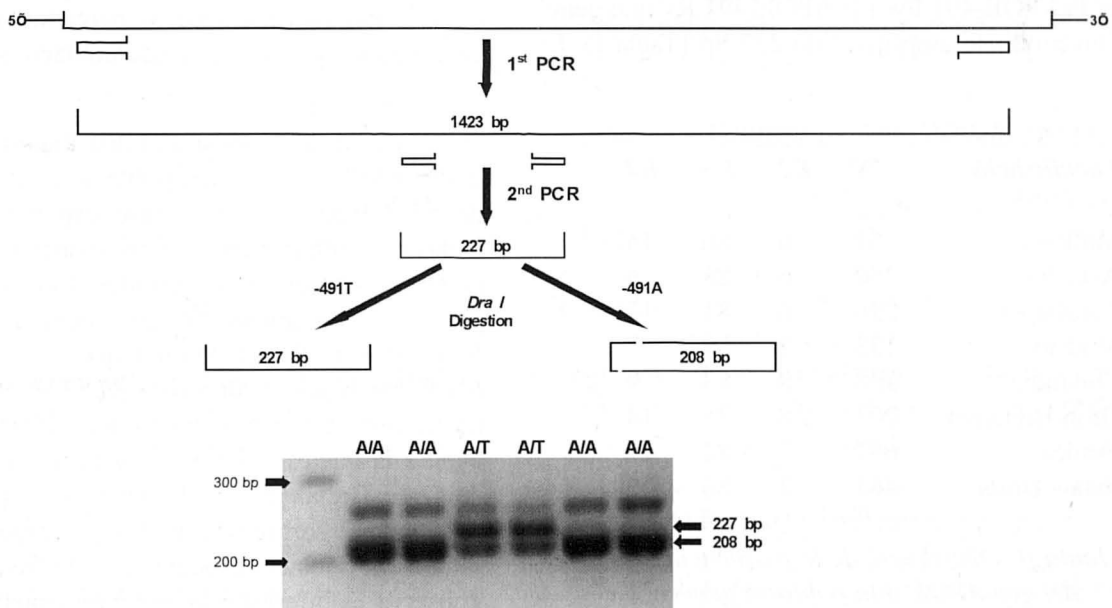
A partir de les mostres sanguínies es va extreure l'ADN mitjançant un sistema comercial i es va emmagatzemar a una concentració de 100 ng/ml en

un congelador de -80°C fins a la seva utilització. En cada cas es va obtenir un consentiment informat de tots els malalts inclosos en aquest estudi. Les mostres del grup control corresponen a 57 donants sans procedents del Banc de Sang.

Determinación de al.lels del gen APOE



PROMOTOR DEL GEN APOE: Polimorfisme -491 A/T



Nom primer	Seqüència (5'-3')	Producte Amplificat	Enzim
APOE-Fw	GCACGGCTGTCCAAGGAGCTGCAGGC	276 bp	Hha I
APOE-Rv	GGCGCTCGCGGATGGCGCTGAG		
Prom-APOE-Fw	CAAGGTCACACAGCTGGCAAC	1423 bp	
Prom-APOE-Rv	TCCAATCGACGGCTAGCTACC		
PrAPOE-491 Fw	TGTTGGCCAGGCTGGTTTTAA	227 bp	Dra I
PrAPOE-491 Rv	CCTCCTTTCCTGACCCTGTCC		

Taula I. Primers utilitzats en aquest estudi.

Determinació del al·lelisme APOE: Es va determinar seguint una tècnica descrita prèviament⁹. Breument, utilitzant els primers APOE-Fw i APOE-Rv es genera un producte amplificat de 276 bp (Taula I). Després de precipitar la reacció de PCR amb acetat sòdic i etanol, el producte de PCR és digerit amb 2 unitats de l'enzim HhaI a 37°C tota la nit. Els productes digerits s'analitzen per electroforesi en un gel d'agarosa al 5% marcat amb bromure d'etidi (10mg/ml). Com es mostra a la figura 1, l'al·lel APOE2 presenta unes bandes principals de 91 i 83 bp, l'al·lel APOE3 presenta bandes de 91, 48 i 35 bp i l'al·lel APOE4 te un patró de 72, 48 i 35 bp.

Determinació del polimorfisme -491 A/T del promotor del gen APOE: Es va dur a terme seguint una tècnica descrita anteriorment²⁰. Breument, es fa servir la tècnica de nested-PCR i després RFLP. La primera reacció de PCR es fa amb els primers Prom-APOE-Fw i Prom-APOE-Rv que generen un producte de 1423 bp (Taula I). Amb 2 ml de la PCR primària es fa una segona reacció de PCR amb els primers PrAPOE-491 Fw i PrAPOE-491 Rv que generen un producte amplificat de 227 bp (Taula I). Es

digereixen 10 µl de la reacció de PCR secundària amb l'enzim DraI a 37°C i els productes de la digestió s'analitzen per electroforesi en un gel d'agarosa al 2% en presència de bromur d'etidi (10 mg/ml). Com es mostra a la figura 2, l'al·lel -491 A presenta dues bandes de 208 i 19 bp, i l'al·lel -491 T presenta una banda de 227 bp.

Anàlisi Estadístic: Les freqüències al·lèliques i genotípiques es van comparar entre el casos i els controls amb una prova de X². L'Odds ratio es va calcular amb un 95% d'interval de confiança.

Resultats i Discussió

En el present treball s'ha estudiat la presència de diversos polimorfismes relacionats amb el gen APOE en un grup de malalts de Mallorca amb un diagnòstic clínic de probable malaltia d'Alzheimer. Els polimorfismes analitzats son els al·lèls del gen APOE (E2, E3 i E4) i el polimorfisme -491 A/T del gen APOE que determina l'estat d'alt o baix producte de la proteïna ApoE. En aquest estudi hem comparat la freqüència d'aquests marcadors amb la que es troba en un grup control de població sana.

A la Taula II es mostra la distribució dels al·lèls del gen APOE a la nostra població control, un grup de 57 donants de sang sense cap patologia. Les dades es comparen amb les freqüències observades en altres poblacions caucasoides. Com es pot comprovar las variacions afecten fonamentalment a la freqüència de l'al·lel APOE4 que oscil·la entre un 6% a la població asturiana²² i un 14 % observat a la nostra població. La nostra freqüència es molt semblant a la que es troba en els estudis en poblacions de Gran Bretanya, Catalunya i els Estats Units¹⁸. Així mateix sorprèn la diferència respecte d'altres estudis en població espanyola on la freqüència que s'observa és inferior a la que hem trobat en el present estudi.

Localització	N	E2	E3	E4
Mallorca	57	6	80	14
Asturies	250	6	88	6
Catalunya	226	6	81	13
Madrid	133	5	88	7
Finlandia	188	8	83	9
Gran Bretanya	203	8	78	14
França	657	7	82	11
Estats Units	463	8	80	12

Taula II. Distribució de la freqüència dels al·lèls del gen APOE a la població general en diferents estudis.

	Freqüència al·lèlica (%)			Distribució genotípica (%)		
	n	A	T	A/A	A/T	T/T
Mallorca	57	76	24	57	37	6
Madrid	133	76	24	55	40	5
Finlandia	188	83	17	72	24	4
Gran Bretanya	203	80	20	63	34	3
França	657	82	18	68	28	4
Estats Units	463	80	20	65	30	5

Taula III. Distribució al·lèlica i genotípica del polimorfisme -491 A/T del promotor del gen APOE a la població general en diferents estudis.

A la Taula III es mostra la distribució al·lèlica i genotípica del polimorfisme -491 A/T del promotor del gen APOE a la població general en diferents estudis. Es pot comprovar com les dades del nostre estudi son pràcticament idèntiques a les d'altres poblacions del nostre entorn. Tenint en compte el desequilibri de lligament entre els al·lèls -491 T/A i APOE4 sorprèn l'existència de diferències notables en la freqüència de l'al·lèl APOE4 (Taula II) que ja hem comentat abans i la pràctica superposició de les dades de freqüència del polimorfisme -491 entre la població de Madrid i la del nostre estudi.

A la Taula IV es mostren els resultats corresponents a la distribució de les freqüències genotípiques i al·lèliques del gen APOE en un grup de 34 malalts diagnosticats de malaltia d'Alzheimer. Com es pot comprovar a la taula, la freqüència al·lèlica de l'al·lèl APOE4 és de 29.41% a la població afectada de malal-

tia d'Alzheimer mentre que aquest al·lèl es troba tan sols en el 14,03% de la població control. Aquesta diferència és estadísticament significativa (p=0,02), amb una Odds ratio de 2,55 (1.21-5,36). També les freqüències del genotip -491 AA es van trobar significativament augmentades en les mostres de malaltia d'Alzheimer en comparació als controls (Taula V). Es pot argumentar que el grup control utilitzat no es el mes adequat ja que no es d'una edat semblant a la del grup de malalts. En els estudis on aquest fet s'ha tingut en compte no s'han observat diferències notòries. En qualsevol cas, això fa que entre la població control estiguin inclosos també aquells individus que arribaran a desenvolupar una malaltia d'Alzheimer. Així dons podem considerar que la diferència que s'observaria si s'utilitzes una població sana d'edat semblant a la població afecte de malaltia d'Alzheimer hauria de ser encara mes gran.

Per tal d'analitzar si l'associació de APOE4 amb la malaltia d'Alzheimer es veia influenciada pel genotip del promotor, es va analitzar el grup de malalts després d'estratificar en funció de la presència o l'absència del genotip -491 AA. Els resultats que es poden

Genotips	Controls (n=57)	Malalts (n=34)
E33	36 (63,15%)	14 (41,08%)
E34	15 (26,31%)	13 (38,24%)
E44	0	3 (8,82%)
E23	4 (7,01%)	2 (5,88%)
E24	1 (1,75%)	1 (2,94%)
E22	1 (1,75%)	1 (2,94%)
Al·lèls		
E2	6,14%	7,35%
E3	79,82%	63,24%
E4	14,03%	29,41%*

*p=0.02; O.R.: 2.55 (1.21-5.36)

Tabla IV. Distribució de les freqüències genotípiques i al·lèliques del gen APOE a Mallorca.

Al·lèls	Controls (n=56)	Malalts (n=34)
-491A	85 (76%)	61 (90%)
-491T	27 (24%)	7 (10%)
Genotips		
-491 A/A	32 (57%)	28 (82%)*
-491 A/T	21 (37%)	5 (15%)
-491 T/T	3 (6%)	1 (3%)

*p=0.02; O.R.: 3.5 (1.25-9.78)

Taula V. Distribució al·lèlica i genotípica del polimorfisme -491 A/T del promotor del gen APOE a Mallorca.

<i>Genotipus</i>	<i>Controls</i>	<i>Malalts</i>
E4/-491 A/A	8	15*
no (E4/-491 A/A)	48	19

*p=0.0039; O.R.= 4.73 (1.72-12.99)

Taula VI: Influència de la combinació de l'al·lel APOE4 amb el genotip -491 A/A.

veure a la Taula VI mostren que dins del subgrup portador del genotip AA, els portadors de l'al·lel APOE4 tenien un increment de mes de quatre vegades en el risc de patir malaltia d'Alzheimer en comparació als controls (p=0,0039; OR=4.73; 1,72-12.99). Aquesta dada coincideix fonamentalment amb les observacions fetes en d'altres poblacions^{18, 23}.

El que no està encara clar és com el polimorfisme del promotor exerceix la seva influència sobre el procés patogènic de la malaltia d'Alzheimer. En aquest sentit, Lambert et al²⁴ han observat que el polimorfisme en el promotor d'APOE esta associat amb la quantitat de peptid amiloide (Ab) present en el cervell de pacients amb malaltia d'Alzheimer, un efecte que és independent del genotip APOE. Per tot el que s'ha exposat, si bé els estudis que han avaluat el significat del genotip APOE4 en el diagnòstic clínic de la malaltia d'Alzheimer han observat que, utilitzat juntament amb la clínica, pot millorar la precisió diagnòstica en un 5-10%²⁵, sembla clar que la presència d'APOE4 no és suficient per predir el risc de patir una malaltia d'Alzheimer.

Sembla que l'al·lel APOE4 es limita a incrementar el risc de desenvolupar la malaltia en aquells individus predisposats a patir-la. Per això, es lògic pensar que han d'existir d'altres factors genètics i/o ambientals que permetin definir aquest risc. Un d'aquests sembla ser el nivell de producció de proteïna determinat per el polimorfisme -491 A/T. No hi han dades respecte de la utilitat d'aquest marcador en el diagnòstic de la malaltia d'Alzheimer. En qualsevol cas la identificació definitiva d'aquest i/o d'altres factors permetran la seva utilització en el diagnòstic presimptomàtic i redundaran en afavorir un correcte diagnòstic de la malaltia d'Alzheimer.

Agraïments: Els autors volen agrair la col·laboració del Dr. Valdivieso i la Dra. Bullido per desenvolupar la tècnica de determinació del polimorfisme -491 A/T del gen APOE. Aquest treball ha estat possible gràcies a un ajut concedit per Laboratoris Esteve.

Bibliografia

- Gouras GK. Exp. Rev. Mol. Med. 2001; 31 May:
- Farrer LA, Myers RH, Cupples LA, et al. 1990; 40: 395-403.
- van Duijn CM, Stijnen T and Hofman A. 1991; 20 Suppl 2: S4-12.
- Bergem AL, Engedal K and Kringlen E. 1997; 54: 264-270.
- Tilley L, Morgan K and Kalsheker N. Mol Pathol. 1998; 51: 293-304.6. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, et al. 1987; 235: 880-884.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, et al. 1991; 349: 704-706.
- Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, et al. Neurobiol Dis. 1996; 3: 159-168.
- Bullido MJ, Guallar_Castillon P, Artiga MJ, et al. Neurosci Lett. 2000; 289: 213-216.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. 1993; 261: 921-923.
- Roses AD. 1996; 47: 387-400.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, et al. 1997; 278: 1349-1356.
- Sorbi S, Nacmias B, Forleo P, et al. 1995; 38: 124-127.
- Blacker D, Haines JL, Rodes L, et al. Neurology. 1997; 48: 139-147.
- Van Broeckhoven C, Backhovens H, Cruts M, et al. 1994; 169: 179-180.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, et al. 1994; 7: 180-184.
- Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, et al. 1994; 3: 569-574.
- Lambert JC, Araria_Goumidi L, Myllykangas L, et al. Neurology. 2002; 59: 59-66.
- Lambert JC, Pasquier F, Cotel D, et al. Hum Mol Genet. 1998; 7: 533-540.
- Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, et al. Nat Genet. 1998; 18: 69-71.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Neurology. 1984; 34: 939-944.
- Alvarez V, Alvarez R, Pena J, et al. Med Clin (Barc). 1999; 113: 441-443.
- Wang JC, Kwon JM, Shah P, Morris JC and Goate A. Neurology. 2000; 55: 1644-1649.
- Lambert JC, Mann D, Goumidi L, et al. Lancet. 2001; 357: 608-609.
- Mayeux R. Alzheimer Dis Assoc Disord. 10 Suppl 1: 38-44.