

Frecuencia elevada del alelo $\epsilon 4$ del gen de apolipoproteína E en una muestra de pacientes con síndrome Down

LUCERO RENGIFO RAMOS*

Bióloga Genetista. Profesora de la Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

JORGE RODRÍGUEZ RUEDA*

Bioquímico. Profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

PAULA A. OSORIO VARGAS*

Tecnóloga Química. Auxiliar de laboratorio. Cenbiotep

MÓNICA Y. SÁNCHEZ CONTRERAS*

Médica General. Miembro del Grupo de investigación de Alzheimer.

ALVARO HERNÁN ALEGRÍA SOTO*

Médico. Ph D Biología Molecular. Director del Cenbiotep.

*Centro de Biología Molecular y Biotecnología (Cenbiotep), Facultad de Ciencias de la Salud. U.T.P.

Resumen:

La enfermedad de Alzheimer es la entidad más frecuente en pacientes con síndrome Down (SD) y a su vez uno de los factores de riesgo para el desarrollo de esta entidad es la presencia del alelo $\epsilon 4$ de apolipoproteína E. En el presente estudio se evaluó el genotipo de apolipoproteína E en un grupo de pacientes de ambos sexos con síndrome Down. Los resultados muestran que hay una frecuencia aumentada para el alelo $\epsilon 4$ en esta población cuando se hizo la comparación con los valores previamente encontrados para una muestra de la población del Departamento de Risaralda que no presentaban SD la cual se tomó como control.

PALABRAS CLAVES: Síndrome Down, Enfermedad de Alzheimer, Apolipoproteína E, Alelo Apo $\epsilon 4$.

Recibido para publicación: 01-04-2002

Aceptado para publicación: 10-05-2002

Introducción

El síndrome Down es la causa más frecuente de retardo mental de origen genético. De acuerdo a estudios poblacionales se presenta con una incidencia de 1-2/1000 recién nacidos vivos⁽¹⁾, la cual se mantiene constante para los diferentes grupos étnicos. Entre un 90-95% presentan un cromosoma 21 extra y en el 96% de los casos este cromosoma extra es de origen materno⁽²⁾. Por medio de análisis de los polimorfismos en el ADN se determinó que este defecto se debe a un error durante la ovogénesis. En el 75% de los casos ocurrió una no disyunción durante la meiosis 1 y en el 25% una no disyunción durante la meiosis 2⁽³⁾. Hasta el momento se considera que la edad materna avanzada es el único factor de riesgo bien documentado en SD⁽⁴⁾. Sin embargo, existen algunos estudios recientes donde la presencia del polimorfismo C677T en la enzima metilte-trahidrofolato reductasa eleva 4 veces el riesgo materno de engendrar hijos con SD, sobre todo en madres jóvenes⁽⁵⁾.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la entidad más frecuente que aparece en los pacientes con SD que viven más de 40 años. Los signos clínicos y síntomas de EA en pacientes con SD los describió Jervis por primera vez en 1948⁽⁶⁾. Las personas con SD desarrollan la EA unos 20 a 25 años más temprano que las personas normales. Todos los individuos con SD presentan los cambios neuropatológicos y neuroquímicos de la EA. Sin embargo, no todos ellos desarrollan los signos clínicos de la demencia tipo Alzheimer⁽⁷⁾. La frecuencia de EA en individuos con SD es 4 a 5 veces mayor que en individuos normales de la misma edad, nivel de funcionalidad, salud y estilo de vida⁽⁸⁾.

La apolipoproteína E (apoE) es una proteína de 299 aminoácidos con un peso molecular de 34 kDa presente en algunas lipoproteínas plasmáticas, participa por lo tanto en el transporte de lípidos y en la redis-

tribución de los mismos entre las células⁽⁹⁾. ApoE es una proteína polimórfica, en humanos, los tres alelos más frecuentes son $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. Estos alelos expresan las correspondientes isoformas de la proteína conocidas como E2, E3 y E4. La isoforma E3 es la que se presenta con mayor frecuencia en la población y se considera como la proteína normal para desempeñar todas las funciones conocidas. Las isoformas E2 y E4 se diferencian de E3 en un aminoácido, así: E2(cys¹¹², cys¹⁵⁸), E3(cys¹¹², arg¹⁵⁸) y E4(arg¹¹², arg¹⁵⁸), estos cambios determinan profundas diferencias funcionales a nivel celular y molecular. Varios estudios han establecido que los portadores del alelo $\epsilon 4$ tienen un riesgo dosis-dependiente de padecer EA; su presencia también determina el cambio de la edad de comienzo de la enfermedad a una edad más temprana^(10, 11, 12). Por el contrario, el alelo $\epsilon 2$ confiere protección contra la EA⁽¹³⁾. Así pues, el genotipo de apoE constituye un importante marcador biológico para establecer la susceptibilidad de un individuo para padecer EA.

Sekijima y cols⁽¹⁴⁾ estudiaron las prevalencias de demencia tipo Alzheimer y del fenotipo apoE en una población de 106 pacientes japoneses con SD. Entre estos pacientes 16 tenían un diagnóstico de EA, cuya prevalencia fue del 0% en el grupo de 30 a 39 años, 16% en el grupo de 40 a 49 años y 38% en los mayores de 50 años. La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en los pacientes con SD y EA fue del 18.8%, considerablemente mayor que la observada en los pacientes con SD pero sin demencia (4.5%) y mayor también que la de los controles japoneses sanos (6.7%). La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en los pacientes con SD que desarrollaron EA antes de los 50 años fue significativamente mayor (28.6%). Ciertamente, los pacientes con SD desarrollaron EA a edades más tempranas pero la prevalencia de la EA en cada grupo de pacientes fue menor que la reconocida previamente. Es muy probable que el alelo $\epsilon 4$ sea un factor de riesgo adicional para EA en pacientes con SD con una predisposición genética a la EA⁽¹⁴⁾.

Se han reportado diferentes valores para las frecuencias con que se presentan estas isoformas de apoE. En un estudio realizado en una muestra poblacional del Departamento de Risaralda (Colombia) con 654 personas de ambos sexos las frecuencias encontradas para los alelos de apoE fueron: $\epsilon 4$, 8.93%; $\epsilon 3$, 83.78%; y $\epsilon 2$, 7.25%. Estos alelos producen seis genotipos comunes y las frecuencias encontradas para cada uno de ellos fueron las siguientes: E4/4, 0.91%; E3/3, 72.47%; E2/2, 1.83%; E3/4, 13.91%; E3/2, 8.71%; y E2/4, 2.14%⁽¹⁵⁾.

Estos datos confirman observaciones previas realizadas con otras poblaciones donde el alelo más común en la población general es $\epsilon 3$, pero a su vez muestran como se presenta una clara diferencia en la distribución de frecuencias para cada uno de los genotipos cuando se comparan con poblaciones como la de Alemania o EEUU⁽¹⁵⁾. Por tal razón, el criterio de normalidad para nuestro genotipo de apoE debe tomar como marco de referencia los resultados obtenidos en el estudio con la población de Risaralda (Colombia). Por ello quisimos indagar la distribución genotípica para apoE en pacientes con SD ya que en este sentido no hemos encontrado reportes concluyentes en la literatura, que indiquen la ausencia de diferencias con lo que podría considerarse como el perfil normal para apoE. Al mismo tiempo, nos interesa conocer el impacto que puede tener el alelo $\epsilon 4$ como factor de riesgo para desarrollar EA a una edad más temprana en esta población de pacientes.

Materiales y métodos

Pacientes: se estudiaron 56 pacientes de ambos sexos, 25 hombres y 31 mujeres procedentes de los centros de educación especial Fundación Centro Integral de Educación Especial (CINDES), Instituto Pedagógico Especializado (INPEE), Instituto Quindiano de Educación Especial (IQEE) y Renacer, distribuidos como se muestra en la tabla 1. Los pacientes se incluyeron en este estudio previo consentimiento informado suscrito por los padres o representantes legales de cada uno de ellos. Los pacientes habían sido diagnosticados para SD por medio de examen clínico y estudios citogenéticos.

Institución	Hombres	Mujeres	Total
CINDES	11	7	18
INPEE	5	6	11
IQEE	6	11	17
RENACER	3	7	10
TOTAL	25	31	56

Tabla 1. Distribución de los pacientes incluidos en este estudio por sexo e institución.

Como control se utilizó un grupo de 654 personas procedentes del área rural y urbana de cada uno de los

municipios del departamento de Risaralda, distribuidos de acuerdo con el aporte porcentual que hace cada uno de ellos a la población total previamente estudiados por Rodríguez y Cediel⁽¹⁵⁾.

Para el análisis estadístico se consideraron dos poblaciones, la población de pacientes con SD y como grupo control la población normal procedente de once municipios del departamento de Risaralda. Se compararon las proporciones de las dos muestras para un intervalo de confianza del 95%.

Extracción de ADN: Para la extracción de ADN se tomó una muestra de sangre de la vena del pliegue del codo, utilizando tubos vacutainer que contenían EDTA. La sangre fue centrifugada inmediatamente, se aislaron las células blancas de la sangre, las cuales fueron utilizadas para la extracción de ADN utilizando el estuche puregene de Gentra (Minneapolis, USA) diseñado para tal propósito.

Detección del genotipo para apolipoproteína E: El genotipo para apo E se estableció mediante amplificación por PCR de un fragmento del gen de apoE de 244 pares de bases. El ADN obtenido se cortó con la enzima de restricción *HhaI* tal como lo describen Hixson y Vernier⁽¹⁶⁾. Los oligonucleótidos F4 (5'-ACAGAATT-CGCCCCGGCCTGGTACAC-3') y F6 (5'-TAAGCTT-GGCACG GCTGTCCAAGGA-3') se utilizaron como iniciadores. Además del amortiguador de amplificación cada reacción de amplificación contiene 1 mg de ADN de leucocitos, 1 pmol/mL de cada iniciador, dimetilsulfóxido al 10% y 0,05 unidades/mL de Taq polimerasa en un volumen final de 30 mL. La amplificación se hizo en un termociclador Perkin Elmer GenAmp 2600. Se denaturó el ADN a una temperatura de 95°C durante 1 minuto y se programaron 30 ciclos de amplificación con temperaturas de ligamiento del iniciador de 62°C durante 15 segundos, extensión de 72°C durante 15 segundos y desnaturalización de 95°C durante 15 segundos. Después de la amplificación por PCR se añadió directamente a cada mezcla de reacción 5 unidades de la enzima de restricción *HhaI* y se incubó a 37°C durante cuatro horas. Los fragmentos de restricción presentes en cada mezcla de reacción se separaron por electroforesis no desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 15% con un espesor de 1,5mm y 20cm de largo preparados con acril: bisacrilamida 19:1 en amortiguador TBE 1X pH 8,3. Se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje constante de 300 V durante 2 horas. Se utilizó como marcador de peso

molecular pUC18 digerido con *MspI*. Se removió cuidadosamente el gel de las placas de vidrio y se reveló el ADN por inmersión del gel durante 5 minutos en una solución de bromuro de etidio con una concentración de 1mg/ml preparada en amortiguador TBE 1X. Finalmente, los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador UV y se registraron utilizando fotografía polaroid. A partir del análisis del patrón de corte por la enzima de restricción se estableció el genotipo.

Resultados

El análisis de los resultados muestra que el genotipo predominante corresponde a la forma homocigota E3/3 con una frecuencia del 62,5%, seguido por el genotipo E3/4 con una frecuencia del 28,6%. Las frecuencias alélicas encontradas para esta población fueron del 3,6%, 78,6% y 17,9% para los alelos e2, e3 y e4 respectivamente. Estos datos se muestran en la tabla 2.

Genotipos	Frecuencia	Frec. Rel.
E2/2	0	0,0%
E2/3	2	3,6%
E2/4	2	3,6%
E3/3	35	62,5%
E3/4	16	28,6%
E4/4	1	1,8%

Alelos	Frecuencia	Frec. Rel.
e2	4	3,6%
e3	88	78,6%
e4	20	17,9%

Patrón	Frecuencia	Frec. Rel.
Homocigot	36	64,3%
Heterocigot	20	35,7%

Tabla 2. Distribución de frecuencias para los genotipos y alelos de apoE en una población de pacientes con SD.

La comparación de estos datos con los obtenidos por Rodríguez y Cediel⁽¹⁵⁾ para la población normal en el estudio realizado por ellos se muestra en la tabla 3. Encontramos que en la población de pacientes con SD se presenta una frecuencia considerablemente aumentada para el alelo e4 (17,86%) si se tiene en cuenta que

la observada para este mismo alelo en la población normal fue de 8,93%. Esta diferencia es altamente significativa y contrasta con los resultados obtenidos por Avramopoulos⁽¹⁷⁾ en un estudio realizado para una población Danesa.

Alelo	Pacientes (N = 56)	Risaralda (N = 654)	p
ε2	3,57%	7,25%	< 0.001
ε3	78,57%	83,78%	< 0.005
ε4	17,86%	8,93%	< 0.001

Tabla 3. Distribución de las frecuencias para el genotipo de apoE y alelos de apoE en una muestra aleatoria de la población de Risaralda y un grupo de pacientes con SD.

Discusión

Existen varias conexiones entre la EA y el síndrome de Down (SD), que inicialmente estimularon la búsqueda de factores genéticos implicados en la etiología de la EA en el cromosoma 21, ya que allí se localiza el gen que codifica para la proteína precursora b-amiloide (PPA) (8); por esto se formuló la hipótesis de que la sobreexpresión del gen para PPA podría ser la causa de la neuropatología observada en adultos con SD. Casi todas las personas con SD muestran evidencia neuropatológica y clínica similar a la de la EA entre los 30 y 40 años de edad. Se sabe desde hace más de 60 años que los cerebros de casi todos los individuos mayores de 40 años con SD muestran clara evidencia de EA. Además la mayoría de los individuos con SD que superan la edad de los 40 años también muestran deterioro cognitivo similar al observado en EA.

A diferencia de los hallazgos previamente mencionados en estudios realizados con muestras pequeñas de pacientes con SD, no se ha encontrado ningún aumento en la frecuencia del alelo ε4^(18,19). Una frecuencia aumentada del alelo ε2 se observó en una muestra de 13 personas con SD⁽²⁰⁾. Se ha sugerido un efecto protector del alelo ε2 en la relación supervivencia/demenia a partir de un estudio realizado en una serie de necropsias de 22 casos de SD con patología de EA y en una serie de 22 pacientes ancianos con SD evaluados clínicamente, el cual también mostró una distribución normal de los alelos apoE indicando que los

mecanismos patogénicos responsables de SD y EA son independientes del genotipo de apoE⁽²¹⁾.

Se ha reportado un riesgo aumentado de EA en madres jóvenes de probandos con SD. Se postuló una susceptibilidad genética compartida para SD y EA que incluía un proceso de envejecimiento acelerado, lo que llevaba al nacimiento de un niño con SD en una madre relativamente joven y a un riesgo aumentado de demencia en la madre. Una aceleración del proceso de envejecimiento biológico fue sugerida previamente a la observación de una prevalencia mayor de canas en las madres jóvenes de niños con SD y apoyada por la evidencia derivada de estudios hechos con ratones, en el sentido de que la edad biológica y no la cronológica es el factor importante en la etiología de la aneuploidía. El estudio de Avramopoulos mostró un aumento en la frecuencia del alelo ε4 de apoE en madres jóvenes con un error en la meiosis II, sugiriendo que este alelo es un factor de riesgo para la no disyunción en la meiosis II del cromosoma 21 en madres jóvenes. El aumento en la frecuencia del alelo ε4 en un subgrupo de madres jóvenes de niños con SD apoya su riesgo aumentado para EA. Sin embargo, el hallazgo de frecuencia normal de ε4 en recién nacidos y fetos con SD está acorde con estudios realizados previamente. En una serie de 22 necropsias de casos de SD donde se encontró patología de EA, esta también mostró una distribución normal de los alelos, indicando que los mecanismos patogénicos responsables de SD y EA son independientes del genotipo apoE.

No obstante, es necesario tener en cuenta que apoE produce la mayor parte de los órganos incluyendo el ovario, donde puede estar involucrado en la segregación cromosómica. La disfunción en la meiosis II podría explicarse tanto por la unión isoforma-específica de apoE a las proteínas asociadas al microtúbulo como por la interferencia de apoE con la estabilidad y función del microtúbulo. De acuerdo a esto podría predecirse que un mayor número de errores de meiosis II en SD podría estar relacionado con una mayor frecuencia del alelo ε4.

A diferencia de los estudios mencionados, en el nuestro encontramos una mayor frecuencia del alelo ε4 en la población de pacientes con SD estudiados. Este hallazgo nos hace partidarios de la posibilidad de que el alelo ε4 esté comprometido de alguna manera en los mecanismos patogénicos de SD.

El alelo ε4 aumenta el riesgo de demencia en pacien-

tes con SD. La combinación de SD con el alelo $\epsilon 4$ conlleva por algún mecanismo a un depósito muy alto de proteína en las placas. Poseer el alelo $\epsilon 4$ también predispone al depósito de proteína β -amiloide (βA) en la vasculatura cerebral de leptomeninges y corteza, por ello el manejo terapéutico de este grupo de pacientes debe tomar muy en cuenta esta condición.

Reconocimientos

Los autores agradecen a la Universidad Tecnológica de Pereira por su decidido apoyo para la realización de esta investigación y a las instituciones de educación de niños especiales que han brindado la colaboración necesaria para la socialización del proyecto.

Referencias bibliográficas

1. Hook EB. Down syndrome. Frequency in human populations and factors pertinent to variation in rates. In de la Cruz FF, Gerald PS, eds. Trisomy 21 (Down syndrome): research perspectives. Baltimore: University Park Press, 1981; 3-67.
2. Antonarakis SE, Lewis JG, Adelsonberger PA, et al. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 1991; 324: 872-876.
3. Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, et al. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 544-550
4. Penrose LS. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J Genet* 1933; 27: 219-224.
5. Isotalo PA, Wells GA, and Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: An examination of C677T and A1298C Mutations. *Am J Hum Genet* 2000; 67:986-990.
6. Jervis GA. Early senile dementia in mongoloid idiocy. *Am J Psychiatr* 1948; 105: 102-106
7. Dalton AJ, Wisniewski HM. Down syndrome and the dementia of Alzheimer disease. *Intern Rev Psychiatr* 1990; 2: 43-52
8. Janicki MP, Dalton AJ. Alzheimer disease in a select population of older adults with mental retardation. *Irish J Psychol* 1993; 14: 38-47.
9. Mahley R.W. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622-630.
10. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, et al. Apolipoprotein E: High-avidity binding to b-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Sci USA* 1993; 90: 1977-1981.
11. Chartier-Harlin M.C., Parfitt M., Legrain S., Pérez-Tur J., Brousseau T., Evans A, et al. Apolipoprotein E $\epsilon 4$ allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 569-574.
12. Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late-onset families. *Science* 1993; 261: 921-923.
13. Corder E.H., Saunders A.M., Risch N.J., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 for late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genet* 1994; 7: 180-184.
14. Sekijima Y., Ikeda S., Tokuda T, et al. Prevalence of dementia of Alzheimer type and apolipoprotein E phenotypes in aged patients with Down's syndrome. *Eur Neurol* 1998; 39: 234-237.
15. Rodríguez J. y Cediél V. Genotipificación de apolipoproteína E en la población de Risaralda. *Rev Med Ris* 1999; 5(1): 2-7.
16. Hixson J.E., and Vernier D. T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.
17. Avramopoulos D., Mikkelsen M. Apolipoprotein E allele distribution in parents of Down's syndrome children. *Lancet* 1996; 9005: 862-865.
18. Van Gool W.A., Evenhuis H.M., van Duijn C.M. A case-control study of apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease associated with Down's syndrome. *Ann Neurol* 1995; 38: 225-230.
19. Wisniewski T., Morelli L., Wegiel J. The influence of apolipoprotein E isotypes on Alzheimer's disease pathology in 40 cases of Down's syndrome. *Ann Neurol* 1995; 37: 136-138.
20. Pickering-Brown S.M., Mann D.M.A., Bourke J.P. et al. Apolipoprotein E4 y Alzheimer's disease pathology in Lewy body disease and in other b-amyloid-forming diseases. *Lancet* 1994; 343:1155-1157.
21. Hardy J., Crook R., Perry R, et al. ApoE genotype and Down's syndrome. *Lancet* 1994; 343: 979-980.

