



Cuba Salud

IV Convención
Internacional de Salud
17-21 de octubre, 2022

Desempeño de un ensayo para la genotipificación de la Apolipoproteína E, útil en la enfermedad de Alzheimer tardío y otras enfermedades no transmisibles.

Yulaimy Batista Lozada¹, Daniel Gutiérrez Luis², Yanin Mokdse Beltrán³ y Yaimé J. González González⁴

¹ Centro de InmunoEnsayo, La Habana, Cuba, yulaimy.batista@cie.cu

² Centro de InmunoEnsayo, La Habana, Cuba, daniel.gutierrez@cie.cu

³ Centro de InmunoEnsayo, La Habana, Cuba, yanin.mokdse@cie.cu

⁴ Centro de InmunoEnsayo, La Habana, Cuba, yaime.gonzalez @cie.cu

Resumen: Introducción: La Apolipoproteína E (ApoE) es una proteína de 299 aminoácidos, esencial en la regulación del metabolismo de los lípidos, actúa como ligando para los receptores hepáticos e interviene en la homeostasis de la glucosa y el colesterol. El gen APOE presenta dos polimorfismos que originan seis genotipos con diferente funcionalidad e impacto. La genotipificación en la enfermedad de Alzheimer tardío identifica los individuos con mayor predisposición. Además, puede orientar al diagnóstico, evaluación de riesgos, prevención y tratamiento en la enfermedad de Parkinson, demencia vascular, cáncer de próstata, aterosclerosis, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 2, enfermedad coronaria, hiperlipoproteinemia tipo III y enfermedad cerebrovascular.

Métodos: Se diseñaron cebadores específicos para cada alelo. El ADN se extrajo de sangre seca sobre papel de filtro utilizando resina Chelex-100. Se realizó PCR en tiempo real específica para cada alelo y un análisis de fusión de alta resolución (HRMA, del inglés *High resolution melting analysis*).

Resultados: Se diseñó y estandarizó un ensayo que amplifica selectivamente fragmentos de ADN correspondientes a los tres alelos del gen APOE mediante PCR alelo-específica. El ensayo mostró una concordancia del 100% con un kit comercial de referencia y los resultados para las tres variantes alélicas fueron precisos y reproducibles, con coeficientes de variación intra e inter-ensayo inferiores al 0,4%.

Conclusiones: Las tres mezclas normalizadas de cebadores alelo-específicos diseñadas para la detección de las tres variantes alélicas del gen APOE demostraron ser específicas en el reconocimiento de las secuencias de interés y permitieron la determinación del genotipo de cada individuo.

Palabras clave: APOE, Enfermedad de Alzheimer tardío, PCR en tiempo real, HRMA

I. INTRODUCCIÓN

La apolipoproteína E (ApoE) es una molécula proteica que contiene 299 residuos de aminoácidos y desempeña un papel importante en el transporte de lipoproteínas, vitaminas liposolubles y colesterol hacia el sistema linfático y posteriormente a la sangre (1). Esta proteína es esencial en la regulación del metabolismo lipídico, actúa como ligando para los receptores hepáticos e interviene en la homeostasis de la glucosa y el colesterol (2).

En los seres humanos, la APOE está codificada por un gen situado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.2), que tiene 4 exones y 3 intrones (3). El gen APOE presenta 3 alelos principales $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, que se transmiten por codominancia y codifican tres isoformas diferentes de la proteína, que se denominan apolipoproteína E2, E3 y E4. Cada isoforma se debe a un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de nucleótido C/T en el exón 4 en las posiciones 112 y 158 de la secuencia aminoácida. El cambio provoca una sustitución de arginina o cisteína (4), por lo que la isoforma APOE2 presenta residuos de cisteína (TGC) en las posiciones 112 y 158, APOE 3 presenta cisteína en 112 (TGC) y arginina (CGC) en 158, mientras que APOE4 presenta arginina (CGC) en ambos sitios. Como resultado, se distinguen seis genotipos de combinación de alelos, tres homocigóticos ($\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 2$) y el resto heterocigóticos ($\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$) (5).

La APOE suele sintetizarse en el tejido hepático, aunque se ha encontrado en otros órganos como el bazo, el riñón y el cerebro. En el cerebro, la APOE es sintetizada y secretada por los astrocitos, y es el principal transportador de colesterol, por lo que puede estar implicada en el mantenimiento y la reparación neuronal. La mayoría de las veces, APOE se une al péptido amiloide y juega un papel importante en su eliminación (6). Las diferencias estructurales en las isoformas de APOE modifican la estructura de la proteína y la afinidad por la unión al receptor hepático, lo que afecta al catabolismo lipídico (7), al metabolismo de la glucosa, a la señalización neuronal, a la neuroinflamación y a la función mitocondrial. Además, estas isoformas tienen un impacto diferente en el mantenimiento de la salud vascular (8).

La presencia del alelo $\epsilon 3$ no parece influir en la aparición de la enfermedad de Alzheimer (EA), sin embargo, podría ser un factor de riesgo en el desarrollo y pronóstico del cáncer de próstata (9). Por otro lado, se ha observado un efecto protector del genotipo $\epsilon 2$ en la conectividad del córtex etéreo, que se asocia a una mejor memoria episódica en personas mayores con alto riesgo de padecer EA. Las frecuencias más altas de $\epsilon 4$ se encuentran en pacientes con EA, también el riesgo de padecerla aumenta tanto para los homocigóticos como para los heterocigóticos (10).

Los estudios de asociación de todo el genoma y de secuenciación del genoma completo en centenarios apuntaron hacia la suma de los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$, como implicados en la consecución de la longevidad extrema (4). El genotipado de APOE podría orientar el diagnóstico hacia la evaluación de riesgos, la prevención y el tratamiento en enfermedades neurodegenerativas, metabólicas y cardiovasculares (8), (9), (10), como la EA tardía, el Parkinson, la demencia vascular, el cáncer de próstata, la aterosclerosis, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus tipo 2, la enfermedad coronaria, la hiperlipoproteinemia tipo III y la enfermedad cerebrovascular. Se utilizan diversos métodos para genotipar los tres principales haplotipos de APOE, la mayoría

de los cuales implican procedimientos costosos y/o arduos que no pueden aplicarse fácilmente en la rutina de los análisis clínicos (8), (11), (12).

OBJETIVO

Desarrollar y evaluar las características funcionales del SUMASIGNAL APOE, un ensayo para la detección de las variantes alélicas del gen APOE mediante el empleo de PCR en tiempo real alelo-específica y el análisis de fusión de alta resolución.

II. MÉTODO

A. Diseño y evaluación de cebadores para la identificación de los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$

Se diseñaron varios cebadores para la identificación del haplotipo: un cebador específico del alelo (para distinguir entre $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$ según el SNP en las posiciones 158 y 112, respectivamente) y un cebador común dirigido al sentido contrario del anterior. En el caso del alelo $\epsilon 3$, ambos cebadores, sentido y antisentido, fueron diseñados específicamente para identificar simultáneamente las sustituciones en las posiciones 112 y 158. Se consultó la base de datos del gen APOE [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ApoE>] para identificar los nucleótidos diana en cada caso, a partir de los cuales se establecieron la longitud y el sentido de los cebadores específicos de los alelos. En cada cebador específico del alelo, el nucleótido del extremo 3'-OH se modificó según el cambio de base descrito para cada variante. Para lograr una mayor especificidad en las amplificaciones, se introdujo un desajuste adicional adyacente al nucleótido 3' terminal.

La especificidad se evaluó comparando las muestras de control con y sin el genotipo con las tres PCR en tiempo real específicas para el alelo (mezclas para la detección individual de $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$).

B. Determinación del valor medio de la temperatura de fusión (T_m) de los productos de la PCR- alelo-específica

Se realizaron PCRs alelo-específicas para amplificar cada uno de los 3 haplotipos del gen APOE, evaluando las muestras de control con la mezcla correspondiente el rendimiento de cada par de cebadores en presencia de una muestra portadora de la variación de ADN correspondiente. Cuatro réplicas por reacción. Las mezclas de reacción y PCR se ejecutaron como se describe en el acápite C. El valor medio de T_m de cada uno de los 3 fragmentos de ADN resultantes se determinó en un paso final de HRMA entre 75-95 °C con una tasa de rampa de 0,01 °C/seg y captura de fluorescencia a 510 nm. Las curvas de fusión se analizaron con la ayuda del software comercial SLAN-96P, versión 8.2.2 (Shanghai Honshi Medical Technology Co. Ltd, Shanghai, China). Los valores de HRMA (antes y después de la fusión) se fijaron entre 75-76 °C y 82-83 °C, respectivamente, para la normalización de la fluorescencia. Para establecer una temperatura de identificación para cada producto amplificado, se calculó el valor medio de T_m con la correspondiente desviación estándar (SD), después de la HRMA.

C. Descripción del ensayo estandarizado:

El SUMASIGNAL APOE permite identificar los seis genotipos del gen APOE ($\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$). El procedimiento del ensayo permite amplificar selectivamente fragmentos de ADN que contienen polimorfismos de un solo nucleótido mediante el uso de la PCR alelo-específica. Estos fragmentos

de tamaño y composición de bases diferentes, son identificados por HRMA a partir del valor de temperatura de desnaturalización media o temperatura de fusión de cada uno de ellos. De esta forma se hace corresponder la detección de un segmento de ADN amplificado con la presencia de la variante específica del gen APOE y las variantes presentes determinan el genotipo del paciente.

El ensayo se realiza en tres etapas:

- a). Extracción del ADN genómico a partir de sangre seca sobre papel de filtro.
- b). PCR alelo-específica (en tres mezclas separadas, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) para la amplificación del ADN genómico previamente extraído, que incluye un paso de HRMA para la detección de las variantes alélicas del gen APOE.
- c). Análisis de los resultados y determinación del genotipo del paciente.

D. Ensayo de Referencia: -

Ensayo de referencia empleado para el estudio de correlación: El ensayo comercial ApoE StripAssay® 4-280. Esta prueba, basada en PCR e hibridación inversa, detecta los seis genotipos de este gen $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 4$. El procedimiento incluye tres pasos: (1) aislamiento del ADN, (2) amplificación por PCR utilizando cebadores marcados con biotina, (3) hibridación de los productos de amplificación en tiras que contienen sondas de oligonucleótidos alelo-específicos fijadas en líneas paralelas. Las secuencias marcadas con biotina unidas a la tira se detectan utilizando estreptavidina-fosfatasa-alcalina, que reacciona con un sustrato de color.

E. Obtención del panel de muestras:

Se colectaron 27 muestras de sangre sobre papel de filtro. Estas provenían de pacientes con EA tardío, caracterizadas por el Centro de Neurociencias de Cuba (CNEURO) y, otras de voluntarios que no padecían ninguna enfermedad neurodegenerativa. Extracción de ADN a partir de sangre total desecada en papel de filtro

El ADN genómico se extrajo de las gotas de sangre total secada sobre papel de filtro con el uso de resina Chelex-100 (Merck, Darmstadt, Alemania) según el protocolo descrito para este tipo de recogida de muestras [Walsh et al., 2013]. Se perforaron tres discos de sangre de 3 mm por muestra con la perforadora manual P51 (Centro de Inmunoensayo, CIE, La Habana, Cuba) y se colocaron en un tubo de 1,5 mL. Tras añadir 1 mL de agua libre de nucleasas, las muestras se incubaron durante 30 min y se centrifugaron a $16\,500 \times g$ durante 2 min, a temperatura ambiente (20-25 °C). Se aspiraron cuidadosamente unos 970 μL del sobrenadante sin llegar al fondo y se desecharon. Los discos de papel se dejaron dentro de los tubos. A los 30 μL restantes se les añadió un volumen de 170 μL de resina Chelex-100 al 5% (SIGMA-ALDRICH® Company, St. Louis, MO, USA) (p/v), seguido de una incubación a 56 °C durante 20 min. A continuación, las muestras se agitaron durante 10 segundos y se incubaron a 100 °C durante 8 minutos. Las muestras se agitaron de nuevo durante 10 s y se centrifugaron a $16\,500 \times g$ durante 2 min, a temperatura ambiente. El sobrenadante con el ADN extraído se transfirió a un tubo nuevo de 1,5 mL. Las muestras se almacenaron a - 20 °C para su uso posterior. Antes de la PCR, las muestras de ADN extraído se templaron a temperatura ambiente, se agitaron en vórtex durante 10 segundos y se centrifugaron a $16\,500 \times g$ durante 2 min, a temperatura ambiente.

F. Análisis del desempeño: Parámetros de validación:

Estudio de correlación: Se evaluaron 27 muestras por el ensayo SUMASIGNAL ApoE y posteriormente se confirmó el de ellas, empleando la prueba de referencia ApoE StripAssay® 4-280. Se determinó el porcentaje de concordancia entre el SUMASIGNAL APOE y los ensayos de referencia.

Especificidad clínica y analítica: Se utilizaron los resultados del estudio de correlación para determinar la especificidad clínica y analítica (reactividad cruzada) del ensayo.

Reproducibilidad: En total se realizaron 100 determinaciones, se realizaron cuatro réplicas de PCR-HRMA para 5 muestras controles por cada mezcla (E2, E3 y E4) en cinco experimentos diferentes por distintos analistas

III. RESULTADOS

Evaluación de cebadores

Se diseñaron y sintetizaron varios cebadores para cada una de las variantes alélicas (regiones de interés) a incluir en el ensayo. Se evaluaron los cebadores diseñados para cada región mediante la comparación del PCR alelo-específico para las muestras caracterizadas. Para evaluar la calidad de la amplificación, se realizó un paso posterior de HRMA y se seleccionaron aquellas parejas de cebadores que permitieran la obtención de una curva alta y estrecha, como indicativo de la especificidad en la reacción. La imagen muestra cómo, de cuatro posibles combinaciones para la detección de $\epsilon 3$, se escogió el par de cebadores que mejor amplificaron (variante 6).

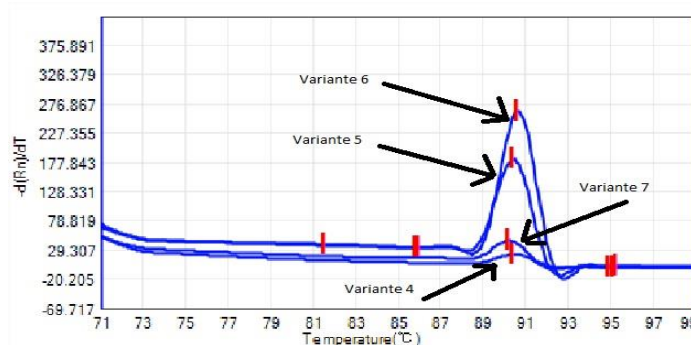


Figura 1 Evaluación de diferentes parejas de cebadores para la detección de E3 en una muestra caracterizada como E3/E3

Determinación de Tm promedio y el genotipo del paciente

Se evaluaron por el estuche comercial, además de los 10 controles, 17 muestras de interés. Todas estas fueron probadas con las mezclas E2, E3 y E4 para realizar el PCR alelo-específico. Se determinaron los valores de Tm de cada fragmento amplificado mediante HRMA a partir de las curvas de fusión y de picos obtenidas en cada caso. La conversión de una curva en otra es una opción del software del sistema SLAN-96P y puede utilizarse a conveniencia por el analista. En la tabla I se muestran los valores de Tm promedio y SD correspondientes a cada fragmento de ADN a partir de la evaluación de las muestras.

Tabla I. Tm promedio obtenida para cada variante alélica, representada con su SD

Variante	Tm Promedio $\pm$ SD ($^{\circ}\text{C}$)	Intervalo ($^{\circ}\text{C}$)	Concentración ($\mu\text{mol/L}$)
$\varepsilon 2$	$91.7 \pm 0,26$	90,8 - 92,6	0,5
$\varepsilon 3$	$90.2 \pm 0,21$	88,65 - 91,06	0,5
$\varepsilon 4$	$86.82 \pm 0,26$	85,19 - 87,96	0,5

En la figura 2 se muestra un ejemplo de la forma en que se obtuvieron los resultados por HRMA para los tres genotipos. En ella se observan las curvas de fusión de fluorescencia en función de la temperatura características de cada variante alélica, mientras que la figura 3 representa su curva de picos correspondiente, a partir de la cual se puede determinar el valor de Tm de los fragmentos de ADN amplificado.

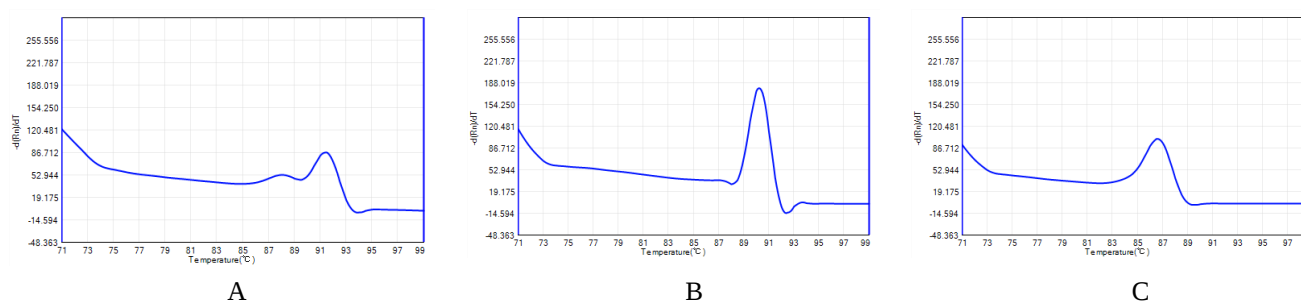


Figura 2 Ejemplo de curvas de fusión tipo para las tres variantes alélicas E2(A), E3 (B) y E4(C)

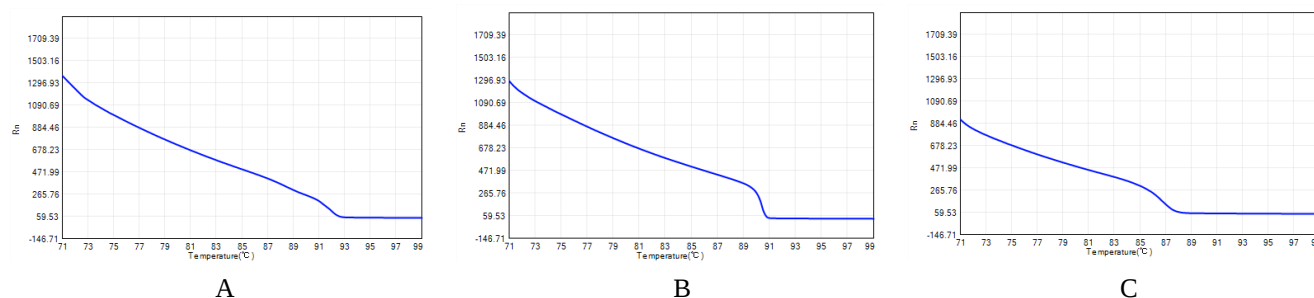


Figura 3 Ejemplo de curvas de fluorescencia tipo para las tres variantes alélicas E2(A), E3 (B) y E4(C)

Todos los picos se detectaron dentro del intervalo de Tm predeterminado, pero con diferencias variables en la altura. Bajo estas condiciones se constituyeron los parámetros de calidad para el ensayo según el genotipo de la muestra analizada. De esta forma quedó establecido bajo que condiciones los resultados se consideran válidos y cuando se debe repetir el procesamiento de la muestra. Estos parámetros se resumen en la tabla II. No se reportaron resultados para el genotipo $\varepsilon 2/\varepsilon 2$ ya que no se encontró en ninguna de las muestras evaluadas.

Tabla II. Parámetros de calidad establecidos para el ensayo, basados en la amplificación específica en uno o dos tubos

Mezcla $\epsilon 2$	Mezcla $\epsilon 3$	Mezcla $\epsilon 4$	Genotipo resultante
$(2 \leq -dF/dT \leq 270)$ $90,8 \leq T_m \leq 92,5$	$(2 \leq -dF/dT \leq 270)$ $88,65 \leq T_m \leq 91,06$	$-dF/dT \leq 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$
$(2 \leq -dF/dT \leq 270)$ $90,8 \leq T_m \leq 92,5$	$-dF/dT \leq 2$	$(2 \leq -dF/dT \leq 270)$ $85,19 \leq T_m \leq 87,96$	$\epsilon 2/\epsilon 4$
$-dF/dT \leq 2$	$(2 \leq -dF/dT \leq 270)$ $88,65 \leq T_m \leq 91,06$	$-dF/dT \leq 2$	$\epsilon 3/\epsilon 3$
$-dF/dT \leq 2$	$(2 \leq -dF/dT \leq 270)$ $88,65 \leq T_m \leq 91,06$	$(2 \leq -dF/dT \leq 270)$ $85,19 \leq T_m \leq 87,96$	$\epsilon 3/\epsilon 4$
$-dF/dT \leq 2$	$-dF/dT \leq 2$	$(2 \leq -dF/dT \leq 270)$ $85,19 \leq T_m \leq 87,96$	$\epsilon 4/\epsilon 4$

Desempeño analítico

Estudio de correlación: Se analizaron un total de 27 muestras por el ensayo **SUMASIGNAL APOE** y posteriormente se confirmó el resultado empleando la prueba de referencia *ApoE StripAssay® 4-280*. El genotipo más frecuente en la población estudiada fue el $\epsilon 3/\epsilon 3$ (54,1 %) lo que coincide con los reportado en la literatura, mientras que las variantes $\epsilon 3/\epsilon 4$ (32,7 %), $\epsilon 4/\epsilon 4$ (8,7 %), $\epsilon 2/\epsilon 3$ (4,1 %) y $\epsilon 2/\epsilon 4$ (1 %), se presentan en menor proporción, coincidiendo también con lo descrito (15). Las frecuencias individuales de cada una son: $\epsilon 3$ con 90,8 %, $\epsilon 4$ con 41,8 % y $\epsilon 2$ con 5,1 %. Como resultado se obtuvo una concordancia del 100 % entre el **SUMASIGNAL APOE** y la prueba de referencia para las 27 muestras evaluadas.

Especificidad: Se demostró que el ensayo **SUMASIGNAL APOE** es capaz de detectar las tres variantes alélicas del gen APOE con buena especificidad, ya que cada variante fue detectada en una sola mezcla ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ o $\epsilon 4$) sin que se produjeran reacciones cruzadas entre ellas.

Reproducibilidad: El ensayo demostró ser reproducible, obteniéndose el mismo genotipo para cada muestra analizada en todas las réplicas de cada experimento realizado. Los coeficientes de variación obtenidos para todas las variantes fueron inferiores a 0,4.

IV. CONCLUSIONES

Las tres mezclas normalizadas de cebadores alelo-específicos diseñadas para la detección de las tres variantes alélicas del gen APOE demostraron ser específicas en el reconocimiento de las secuencias de interés, y permitieron la determinación del genotipo de cada individuo. Los estudios de desempeño mostraron una correlación del 100% entre el **SUMASIGNAL APOE** y el ensayo *ApoE StripAssay® 4-280*, y una muy alta reproducibilidad con coeficientes de variación inferiores 0,4.

REFERENCIAS

1. Cacho J., et al. Genotipo y fenotipo de la apolipoproteína E en enfermos de Alzheimer en Castilla y León. (1997). Último acceso 2 de enero de 2008
2. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall Jr S.C., Weisgraber K.H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. (1984). Journal of Lipid Research. 25 (12) 1277-1294.

3. Paik Y.K., D.J. Chang, C.A. Reardon, G.E. Davies, R.W. Mahley, y J.M. Taylor. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(10): 3445–3449.
4. Henry J.B. El laboratorio en el diagnóstico clínico. Madrid: Marban; 2005 y Feng J, Xiang L, Wan G, Qi K, Sun L, Huang Z, et al. Is APOE e3 a favourable factor for the longevity: An association study in the Chinese population? *J Genet*. 2011; 90:343-7.
5. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(5):333–344.
6. Bagyinszky E., Y.C Youn, S. Soo y S.Y. Kim. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*. 2014; 9:535-51
7. Anoop S., A. Misra, K. Meena, K. Luthra. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular and coronary heart diseases. *Indian J Med Res*. 2010; 132:363-78
8. Giau V.V., Bagyinszky E., An S.S, Kim S.Y. Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2015;11, pp 1723–1737
9. Faruk Y., Seda Gulec Y., Asif Y., Uzay G., Emre Murat A., et al. Apolipoprotein E Genotypes in Patients with Prostate Cancer. *Anticancer Research*, 2016. 36; pp 707-712.
10. Moreno-Grau S., Rodriguez-Gomeza O., Sanabriaa A., Perez-Cordona A., Sanchez-Ruiza D., et al. Exploring APOE genotype effects on AD risk and b-amyloid burden in individuals with subjective cognitive decline: The FACEHBI study baseline results. *Alzheimer's & Dementia*, 2017 pp 1-10.
11. García A.M. La apolipoproteína E: el polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos, los hábitos alimenticios y el origen étnico. *Revista Colombiana de Cardiología*. 2003; 10 (4): 189-194.
12. Cacciaglia R., J.L. Molinuevo., C. Falcón, A.Brugulat-Serrat, G. Sánchez-Benavides, et al. Effects of APOE-ε4 allele load on brain morphology in a cohort of middle-aged healthy individuals with enriched genetic risk for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2018; 14: 902-912.