

Mutaciones en el gen de la hemocromatosis (HFE), APOE y la enfermedad de Alzheimer. Un estudio basado en población

Millán MR, Alizadeh BZ, Njajou OT, Hofman A, Breteler MM, van Duijn CM

RESUMEN

Introducción: El hierro ha sido implicado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los portadores de las mutaciones C282Y y H63D en el gen de la hemocromatosis hereditaria (HFE) tienen niveles séricos elevados de hierro y pueden tener un aumento en el riesgo para EA. **Objetivos:** Nuestro objetivo fue investigar la relación de las mutaciones C282Y y H63D en el gen HFE y sus interacciones con el gen de la apolipoproteína E (APOE) en la incidencia, la edad de inicio y la mortalidad de la EA, en un estudio de seguimiento basado en población, el estudio Rotterdam. **Material y métodos:** Comparamos la frecuencia de las mutaciones C282Y y H63D en el gen HFE en 230 casos incidentes de EA a la de 2018 sujetos controles sin demencia seleccionados aleatoriamente. También comparamos la edad promedio al inicio y la mortalidad en este grupo de pacientes por los alelos HFE. **Resultados:** En el total, no hubo alguna diferencia significativa en la frecuencia de las mutaciones en el gen HFE en los casos comparada a la de los controles. La homocigocidad para la mutación H63D fue más frecuente en pacientes con EA que fueron portadores del alelo APOEε4 (4.0%) comparada a los controles (2.2%, RM 3.1, IC 95% 0.8-12.6; $p = 0.1$), particularmente en hombres (RM 17.5; IC 95% 2.5-124.5; $p < 0.001$). La edad de inicio fue más temprana en homocigotos H63D comparada a la de los no portadores de la mutación H63D (78.2 ± 1.6 contra 82.2 ± 0.6 años), tanto en portadores como en no portadores del alelo APOEε4. No hubo alguna diferencia significativa en la mortalidad por las mutaciones en el gen HFE. **Conclusiones:** En el total, las mutaciones en el gen HFE no estuvieron asociadas con EA. Sin embargo, la mutación H63D en el gen HFE puede modificar el riesgo de EA en presencia del alelo APOEε4. La edad de inicio puede ser anticipada en pacientes que son homocigotos H63D. **Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer, apolipoproteína, mutaciones, gen HFE.

Rev Mex Neuroci 2004; 5(1): 14-23

Mutations in hemochromatosis gene (HFE), APOE and Alzheimer's disease. A population-based study

ABSTRACT

Introduction: Iron has been implicated in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Carriers of HFE C282Y and H63D mutations have elevated serum iron levels and may have an increased risk for AD. **Objectives:** In a population-based follow up study, the Rotterdam Study, we investigated the relation between HFE C282Y and H63D mutations and their interactions with apolipoprotein E (APOE) on the incidence, age at onset and mortality in AD. **Material and methods:** We compared the frequency of HFE C282Y and H63D mutations in 230 incident cases of AD with that of 2,018 randomly selected non-demented controls. We also compared the mean age at onset and mortality in this set of AD patients by HFE alleles. **Results:** Overall, there was no significant difference in the frequency of HFE mutations in cases compared to controls. Homozygosity for H63D was more frequent in AD patients who were APOEε4 carriers (4.0 %) compared to controls (2.2%; OR 3.1; 95% CI 0.8-12.6; $p = 0.1$), particularly in men (OR 17.5; 95% CI 2.5 - 124.5; $p < 0.001$). Age at onset was earlier in H63D homozygotes compared to H63D non carriers (78.2 ± 1.6 vs. 82.2 ± 0.6 years), both in APOEε4 carriers and non carriers. There was no significant difference in mortality by HFE mutations. **Conclusions:** Overall, mutations in the HFE gene were not associated with AD. However, HFE H63D mutation may modify the risk of AD in presence of APOEε4 allele. Age at onset may be anticipated in AD patients who are H63D homozygotes. **Key words:** Alzheimer's disease, apolipoprotein E, gene mutations of HFE.

Rev Mex Neuroci 2004; 5(1): 14-23

Departamento de Epidemiología & Bioestadísticas, Erasmus MC Rotterdam, Los Países Bajos.

Correspondencia: Cornelia M van Duijn PhD.

Genetic Epidemiology Unit. Department of Epidemiology & Biostatistics. Erasmus MC Rotterdam. PO Box 1738, DR 3000 Rotterdam The Netherlands. Tel. +31 10 408 9406, Fax +31 10 408 9406
E-mail: c.vanduijn@erasmusmc.nl

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad compleja y uno de los trastornos más comunes en el anciano, con una incidencia de 9.8 por 1,000 personas/año.¹⁻³ El riesgo de la enfermedad se eleva exponencialmente con la edad avanzada, y debido a la desviación en la pirámide poblacional y al aumento en la esperanza de vida, la incidencia de la enfermedad también aumenta.² La EA es clínicamente caracterizada por un deterioro progresivo en la memoria y en otras funciones cognitivas, del lenguaje, ejecutivas y conductuales,⁴ lo cual terminará en un estado de completa dependencia.

Tanto factores genéticos y ambientales como sus interacciones tienen efectos sobre diversas características del fenotipo clínico de la EA.⁴ Es generalmente aceptado que los factores genéticos pueden contar hasta en 60% en la etiología de la enfermedad.⁵ Sin embargo, la contribución total de las mutaciones conocidas para la ocurrencia de EA en la población general es estimada en solamente alrededor de 18%, de tal manera que otros factores genéticos pueden contribuir al riesgo para la enfermedad.⁶

Uno de los eventos más tempranos en la EA es el estrés oxidativo, el cual es potenciado por metales de transición como el hierro.^{7,8} El hierro puede contribuir a la neuropatogénesis de la EA a través de la generación de radicales libres.^{7,9,10} En muestras de tejido cerebral de pacientes con EA han sido detectados un aumento en las cantidades de hierro unido sin cohesión¹¹ y una acumulación de hierro en las placas de amiloide y en los ovillos de degeneración neurofibrilar,¹² las dos principales características patológicas de la EA. Dos de las mutaciones comunes en el gen de la hemocromatosis hereditaria (*HFE*), las mutaciones C282Y y H63D están asociadas en los portadores con un aumento en los niveles de hierro.¹³⁻¹⁷ Pulliam J y cols. (2003)¹⁸ han sugerido que las mutaciones en el gen *HFE* están asociadas con un aumento del estrés oxidativo y con los cambios patológicos similares a los de la EA. Recientemente, Moalem S y cols. (2000)¹⁹ reportaron que las mutaciones en el gen *HFE* estuvieron sobrerrepresentadas en hombres con EA familiar. Sampietro M y cols. (2001)²⁰ encontraron que las mutaciones en el gen *HFE* pueden anticipar la presentación clínica de la EA en individuos susceptibles, aunque este hallazgo no fue apoyado por Candore y cols. (2003).²¹ Un estudio reciente demostró que la mutación H63D y el alelo *APOEε4* comparten un efecto sinergista sobre la edad de inicio de la EA.²² Estos estudios^{20,21} fueron estudios de casos y controles en los cuales se estudiaron pacientes prevalentes, con un bajo número de casos obtenidos de registros hospitalarios.

Hasta la fecha ningún estudio a nivel poblacional ha sido realizado para investigar el rol de las mutaciones en el gen *HFE* sobre la EA usando casos incidentes de la enfermedad.

En un estudio de seguimiento basado en población, nosotros investigamos la relación de las mutaciones en el gen *HFE*, el alelo *APOEε4* y el riesgo, la edad de inicio y la mortalidad en pacientes incidentes de EA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Participantes

Los participantes fueron derivados de un estudio prospectivo basado en población de personas de 55 años o más residentes en un suburbio de Rotterdam en los Países Bajos, el estudio Rotterdam, cuyo diseño y objetivos han sido explicados previamente.²³ En total, 7,983 personas participaron en el estudio (tasa de respuesta de 78.0%). El reclutamiento completo de los sujetos, la adquisición de datos y el examen de línea basal tuvieron lugar entre 1990 y 1993 por medio de una entrevista estructurada utilizando un cuestionario estandarizado. Los participantes fueron seguidos por 13.4 años. Dos exámenes de seguimiento tuvieron lugar en 1994-1996 y en 1998-1999, durante los cuales los participantes fueron sometidos al mismo protocolo como el del examen de línea basal. En el estudio Rotterdam, la información sobre el estado de salud y de enfermedad fue obtenida a intervalos regulares de las autoridades de salud municipal en Rotterdam y de los médicos generales locales, así como directamente de los participantes durante las visitas de seguimiento. Las muestras sanguíneas fueron colectadas por venopunción en el día del examen de línea basal. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Médica del Centro Médico Erasmus y el consentimiento informado fue obtenido de cada uno de los participantes. De los sujetos que fueron elegibles, 7,528 (94.3%) fueron examinados en sus funciones cognitivas en el estudio de demencia y 482 (6.5%) recibieron el diagnóstico de demencia. De los 395 (6.0%) pacientes incidentes de demencia, 263 casos (3.8%) fueron definidos como primer diagnóstico de EA. Nuestro estudio ha sido enfocado en pacientes incidentes de EA. Por definición, los participantes con un diagnóstico de demencia en el examen de línea basal o de demencia debida a otras causas fueron excluidos del análisis. La edad al diagnóstico de demencia fue confirmada durante la entrevista de seguimiento y por usar la base de datos del médico general o los registros médicos hospitalarios de los pacientes incidentes de EA. De los pacientes incidentes de EA, 166 (72.2%) murieron durante el seguimiento.

De los sujetos con un MMSE de 26 o más en las revisiones de seguimiento, seleccionamos como controles a 2,018 personas sin una historia de enfermedad neurológica o de enfermedad vascular cerebral.

DIAGNÓSTICO DE DEMENCIA

El diagnóstico de demencia estuvo basado en una prueba combinada del examen básico del estado mental (MMSE) y del esquema geriátrico del estado mental (GMS-A).¹ De los sujetos con un puntaje de 25 o menos en el MMSE o de 1 o más en el GMS, a 2.0% se les realizó la entrevista diagnóstica de CAMDEX, el examen Cambridge para trastorno mental del anciano.²⁴ Los participantes con un puntaje de menos de 80 sobre este examen o de quienes se tuvo la sospecha de padecer demencia con base en la información clínica fueron invitados a participar en un tercer examen extenso realizado por un neurólogo, un neuropsicólogo, y se les realizó un estudio de neuroimagen (por IRMN). La demencia fue diagnosticada de acuerdo con los criterios de la Asociación Psiquiátrica Americana (DSM-III-R).²⁵ El subdiagnóstico de posible o probable EA estuvo basado en los criterios del "National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorder Association" (NINCDS-ADRDA).²⁶ El seguimiento de los sujetos que no fueron revisados en persona se completó por evaluar los registros médicos de los 7,046 participantes que no tuvieron demencia en el examen de línea basal.

MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN

El ADN genómico fue extraído de "buffy coat" congelado usando el protocolo "salting out".²⁷ Los análisis de las mutaciones C282Y y H63D en el gen *HFE* fueron practicados como ha sido descrito previamente.¹⁶ La combinación de las cuatro variantes *HFE* fue categorizada en seis grupos de genotipos i.e., sin alguna mutación (homocigotos tipo "wild", Wt/Wt), los heterocigotos H63D (H63D/Wt), los heterocigotos C282Y (C282Y/Wt), los heterocigotos compuestos (C282Y/H63D) y los homocigotos C282Y (C282Y/C282Y). Los participantes fueron categorizados de acuerdo con ser o no portadores de alguna de las mutaciones H63D o C282Y; los no portadores de la mutación H63D aquellos que no portaron alguna copia del polimorfismo H63D (i.e. Wt/Wt, Wt/C282Y, C282Y/C282Y), los heterocigotos H63D aquellos que portaron una copia de H63D (i.e. H63D/C282Y, Wt/H63D) y los homocigotos H63D aquellos que portaron dos copias de H63D (i.e. H63D/H63D); los no portadores de la mutación C282Y aquellos que no portaron alguna copia del polimorfismo C282Y (i.e. Wt/Wt, Wt/H63D, H63D/H63D), los hete-

rocigotos C282Y aquellos que portaron una copia de C282Y (i.e. Wt/C282Y, H63D/C282Y) y los homocigotos C282Y aquellos que portaron dos copias de C282Y (i.e. C282Y/C282Y). Los genotipos *HFE* fueron disponibles para 230 de los casos incidentes de EA.

El genotipo *APOE* fue practicado como ha sido descrito en otra parte.²⁸ Los participantes fueron asignados a uno de dos grupos, aquellos con o sin *APOEε4*. La genotipificación de ambas mutaciones en *HFE* y de los polimorfismos *APOE* fue practicada sin conocer el estado de enfermedad. Ambos genotipos *HFE* y *APOE* fueron disponibles para 219 pacientes incidentes de EA y para 1,930 sujetos controles.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias de los genotipos *HFE* y *APOE* fueron probadas para las proporciones del equilibrio Hardy-Weinberg utilizando el programa estadístico HWE.²⁹ Las comparaciones simples fueron evaluadas con las pruebas *t* and χ^2 , de acuerdo con lo que fue apropiado. El riesgo relativo de EA fue estimado como una razón de momios (RM) en un modelo de regresión logística múltiple y presentado con un intervalo de confianza de 95% (IC 95%) usando a los no portadores de las mutaciones H63D o C282Y como la referencia. Las diferencias en la edad de inicio de EA fueron examinadas en un modelo de regresión lineal múltiple y el porcentaje de la varianza explicada fue estimada computando el coeficiente de correlación (r^2). La mortalidad en los pacientes con EA con o sin las mutaciones en el gen *HFE* fue comparada por las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier usando el estadístico de prueba log-rank. Para solventar posibles confusores usamos el análisis de riesgos proporcionales de Cox. La edad basal y el sexo fueron variables predictoras y el número de años a la edad de muerte fue la variable tiempo. La modificación del efecto de la relación entre los heterocigotos *HFE* y el alelo *APOEε4* sobre la EA fue explorada por estratificar los datos en cuatro categorías. La primera categoría consistió en no portadores de las mutaciones *HFE* y en no portadores del alelo *APOEε4* (grupo de referencia), la segunda categoría en heterocigotos H63D y C282Y *HFE* y en no portadores del alelo *APOEε4*, la tercera categoría en no portadores de las mutaciones *HFE* y en portadores del alelo *APOEε4* y la última categoría en heterocigotos H63D y C282Y *HFE* y en portadores del alelo *APOEε4*. Debido a que los heterocigotos H63D y C282Y *HFE* no son genotipos de riesgo, una modificación del efecto es poco probable en ausencia del alelo *APOEε4*. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software SPSS para Windows (versión 11.0) y el software Splus versión 6.0.

RESULTADOS

Las características de línea basal de los sujetos con EA incidente y de los sujetos sin demencia son presentadas en la tabla 1. La edad promedio de los pacientes con EA fue mayor que la de los controles (78.5 ± 0.5 contra 65.8 ± 0.1 años) y las mujeres fueron más frecuentemente afectadas. Todos los factores de riesgo vascular tales como diabetes mellitus, hipertensión e indicadores de aterosclerosis carotídea como el engrosamiento de la íntima media (IMT) y el puntaje de placa aterosclerótica en las arterias carótidas fueron estadísticamente más frecuentes en personas enfermas que en personas sin demencia. El tabaquismo fue significativamente

menos frecuente en los pacientes con EA comparado a los controles. Los portadores *APOEε4* fueron significativamente ($p < 0.05$) más frecuentes en pacientes con EA que en los controles. No hubo una desviación significativa de las proporciones del equilibrio Hardy-Weinberg para la frecuencia de genotipos y alelos *HFE* y *APOE*.

En el total, la frecuencia de homocigidad para la mutación H63D en pacientes con EA (3.0%) no fue significativamente diferente comparada a los controles (2.7%), conduciendo a una razón de momios (RM) de 1.4 con un intervalo de confianza de 95% de 0.5-3.5 ($p = 0.5$). No hubo diferencia entre la frecuencia de heterocigidad para la mutación

Tabla 1
Características de línea basal de la población de estudio

	Controles	EA Incidente
Número de sujetos	2018	230
Edad en años (promedio \pm EE)	65.85 ± 0.15	$78.54 \pm 0.51^*$
Mujeres (%)	52.4	71.7*
Diabetes mellitus (%)	2017 (9.4)	229 (15.3)*
Hipertensión (%)	1985 (30.1)	218 (39.9)*
Tabaquismo (%)	1631	178
Actual	24.8	15.2*
Fumador inicial	45.6	33.7*
Nunca fumador	29.6	51.1*
Aterosclerosis		
IMT ≥ 0.89 mm en arterias carótidas (%)	1376 (16.8)	144 (36.8)*
Puntaje de placa ≥ 3 en arterias carótidas (%)	1374 (12.7)	147 (26.5)*
Portadores <i>APOEε4</i>	1930 (28.5)	219 (45.2)*

* Significativamente diferente de la población control, $p < 0.05$.

Tabla 2a
Enfermedad de Alzheimer incidente por las mutaciones *HFE* en hombres

	No portadores	Heterocigoto H63D	Homocigotos H63D	No portadores	Heterocigotos C282Y	Homocigotos C282Y
Total						
Controles (N = 960)	70.9	26.3	2.8	88.4	11.4	0.2
EA incidente (N = 65)	70.8	23.1	6.2	92.3	7.7	-
RM (IC 95%)*	Referencia	0.8 (0.4-1.6)	2.1 (0.6-7.2)	Referencia	0.6 (0.2-1.7)	-
Edad al inicio (Promedio \pm EE)	79.6 ± 1.0	79.0 ± 1.9	76.4 ± 2.1	79.1 ± 0.8	80.9 ± 2.9	-
% de muerte en EA incidente	78.3	86.7	50.0	80.0	60.0	-
HR (IC 95%)*	Referencia	0.9 (0.4-1.9)	1.1 (0.8-1.4)	Referencia	1.2 (0.3-3.9)	-
<i>APOEε4</i> (-)						
Controles (N = 670)	69.0	28.1	3.0	89.7	10.1	0.1
EA incidente (N = 32)	68.8	28.1	3.1	90.6	9.4	-
RM (IC 95%)*	Referencia	1.0 (0.4-2.4)	1.1 (0.1-10.4)	Referencia	0.6 (0.1-2.7)	-
Edad al inicio (Promedio \pm EE)	80.0 ± 1.4	83.0 ± 1.7	79.3	80.5 ± 1.2	83.4 ± 4.3	-
% de muerte en EA incidente	86.4	77.8	100.0	86.2	66.7	-
HR (IC95%)*	Referencia	2.3 (0.7-7.3)	1.0 (0.7-1.5)	Referencia	1.5 (0.3-6.7)	-
<i>APOEε4</i> (+)						
Controles (N = 254)	75.2	23.2	1.6	85.4	14.2	0.4
EA incidente (N = 33)	72.7	18.2	9.1	93.9	6.1	-
RM (IC 95%)*	Referencia	0.7 (0.2-2.0)	17.5 (2.5-124.5) ^a	Referencia	0.6 (0.1 - 2.7)	-
Edad al inicio (Promedio \pm EE)	79.1 ± 1.3	73.0 ± 2.3 ^b	75.4 ± 2.7	77.7 ± 1.2	77.1 ± 2.5	-
% de muerte en EA incidente	70.8	100.0	33.3	74.2	50.0	-
HR (IC 95%)*	Referencia	0.4 (0.1-1.3)	0.9 (0.6-1.4)	Referencia	0.8 (0.9-6.9)	-

* Razón de momios (RM) y razón de riesgo (HR) ajustado para edad.
a. $p < 0.001$. b. $p < 0.05$.

Tabla 2b
Enfermedad de Alzheimer incidente por las mutaciones HFE en mujeres

		No portadores	Heterocigoto H63D	Homocigotos H63D	No portadores	Heterocigotos C282Y	Homocigotos C282Y
Total	Controles (N = 1058)	73.4	24	2.6	87.5	12.1	0.4
	EA incidente (N = 165)	73.3	24.8	1.8	91.5	8.5	-
	RM (IC 95%)*	Referencia	1.2 (0.7-1.9)	1.0 (0.2-3.7)	Referencia	0.5 (0.2-1.0)	-
	Edad al inicio (Promedio ± EE)	83.3 ± 0.7	82.1 ± 1.2	80.6 ± 1.9	82.7 ± 0.6	85.5 ± 1.8	-
	% de muerte en EA incidente	71.1	63.4	100.0	68.2	85.7	-
	HR (IC 95%)*	Referencia	1.6 (0.8-2.8)	0.8 (0.7-1.1)	Referencia	1.0 (0.5-1.8)	-
APOEε4 (-)	Controles (N = 710)	73.1	24.2	2.7	87.6	12.0	0.4
	EA incidente (N = 88)	78.4	19.3	2.3	93.2	6.8	-
	RM (IC 95%)*	Referencia	0.8 (0.4-1.6)	1.3 (0.2-7.0)	Referencia	0.3 (0.1-0.8) ^a	-
	Edad al inicio (Promedio ± EE)	84.3 ± 1.0	83.7 ± 1.8	82.3 ± 1.8	83.7 ± 0.9	90.7 ± 1.0 ^a	-
	% de muerte en EA incidente	81.2	82.4	100.0	81.9	83.3	-
	HR (IC 95%)*	Referencia	1.2 (0.6-2.7)	0.8 (0.6-1.1)	Referencia	1.6 (0.6-4.2)	-
APOEε4 (+)	Controles (N = 296)	73.0	24.3	2.7	87.2	12.5	0.3
	EA incidente (N = 66)	65.2	33.3	1.5	89.4	10.6	-
	RM (IC 95%)*	Referencia	1.9 (0.9-4.1)	0.5 (0.1-6.0)	Referencia	1.0 (0.3-3.0)	-
	Edad al inicio (Promedio ± EE)	81.4 ± 0.9	80.6 ± 1.6	77.3	81.0 ± 0.8	80.8 ± 2.3	-
	% de muerte en EA incidente	51.2	45.5	100.0	45.8	85.7	-
	HR (IC 95%)*	Referencia	2.5 (0.8-7.4)	0.7 (0.5-1.1)	Referencia	0.5 (0.2-1.3)	-

* Razón de momios (RM) y razón de riesgo (HR) ajustado para edad.
a. $p < 0.05$.

H63D en pacientes con EA comparada a los controles (RM 1.0; IC 95% 0.7-1.5; $p = 0.9$). No tuvimos homocigotos C282Y en pacientes incidentes de EA. Los sujetos heterocigotos para la mutación C282Y fueron significativamente ($p = 0.05$) menos frecuentes entre los pacientes con EA (8.3%) comparados a los controles (11.7%; RM 0.5; IC 95% 0.3-1.0). En el total, en los no portadores del alelo *APOEε4*, no hubo diferencia para la mutación H63D. Se observó una disminución significativa en la frecuencia de heterocigocidad para la mutación C282Y en pacientes con EA (7.5%) comparada a los controles (11.1%; RM 0.3; IC 95% 0.1-0.9; $p < 0.05$). En los portadores de *APOEε4*, hubo un aumento en la frecuencia de homocigotos H63D entre los pacientes con EA incidente (RM 3.1; IC 95% 0.8-12.6; $p = 0.1$). No hubo diferencia para heterocigocidad para la mutación C282Y en pacientes con EA comparada a los controles. La frecuencia de portar una o dos copias de la mutación H63D o C282Y, la edad al inicio de EA en los pacientes y la mortalidad en los pacientes con EA, para hombres y mujeres, son presentadas en las tablas 2a y 2b, respectivamente. Entre los pacientes masculinos que fueron portadores de *APOEε4*, 9.1% fue homocigoto H63D comparado a 1.6% de los controles masculinos (RM 17.5; IC 95% 2.5-124.5; $p < 0.001$). La disminución en la frecuencia de heterocigocidad para la mutación C282Y no fue significativa en los hombres, portadores *APOEε4* y no portadores *APOEε4*, comparada a los controles correspondientes. En mujeres que fueron no portadoras *APOEε4*, hubo una disminución significativa de heterocigotos C282Y en EA incidente

comparada a los controles (RM 0.3; IC 95% 0.1-0.8; $p < 0.05$).

La edad promedio global al inicio de enfermedad fue más temprana en los homocigotos H63D (78.2 ± 1.6 años) comparada a la de los no portadores H63D (82.2 ± 0.6 años). La misma tendencia en la edad de inicio fue observada para la mutación H63D en los no portadores *APOEε4* y en portadores *APOEε4* (Figura 1). La edad de inicio en heterocigotos C282Y fue más tardía (84.3 ± 1.5 años) comparada a la de los no portadores C282Y (81.7 ± 0.5 años). La edad más temprana de inicio en los homocigotos H63D fue consistente en hombres y en mujeres. En hombres que fueron portadores del alelo *APOEε4*, los heterocigotos H63D mostraron una edad más temprana significativa comparada a la de los portadores H63D (73.0 ± 2.3 años contra 79.1 ± 1.3 años, $p < 0.05$).

La mortalidad total en pacientes con EA no fue diferente por las mutaciones HFE. El porcentaje de muerte fue ligeramente mayor en los heterocigotos H63D sin el alelo *APOEε4* en hombres ($p = 0.1$) y con el alelo *APOEε4* en mujeres ($p = 0.1$).

El efecto de ser portador del alelo *APOEε4* sobre la relación entre la heterocigocidad para las mutaciones HFE y la EA es presentada en la tabla 3. La frecuencia de heterocigocidad para las mutaciones HFE en aquellos que fueron no portadores *APOEε4* fue más baja en los pacientes con EA (15.6%) comparada a la de los controles (25.1%). La frecuencia de portadores del alelo *APOEε4* en quienes fueron no portadores de las mutaciones HFE fue más alta en pacientes con EA (27.5%) comparada a la de los controles (18.6%; RM 2.5; IC 95% 1.5-3.8; $p < 0.001$).

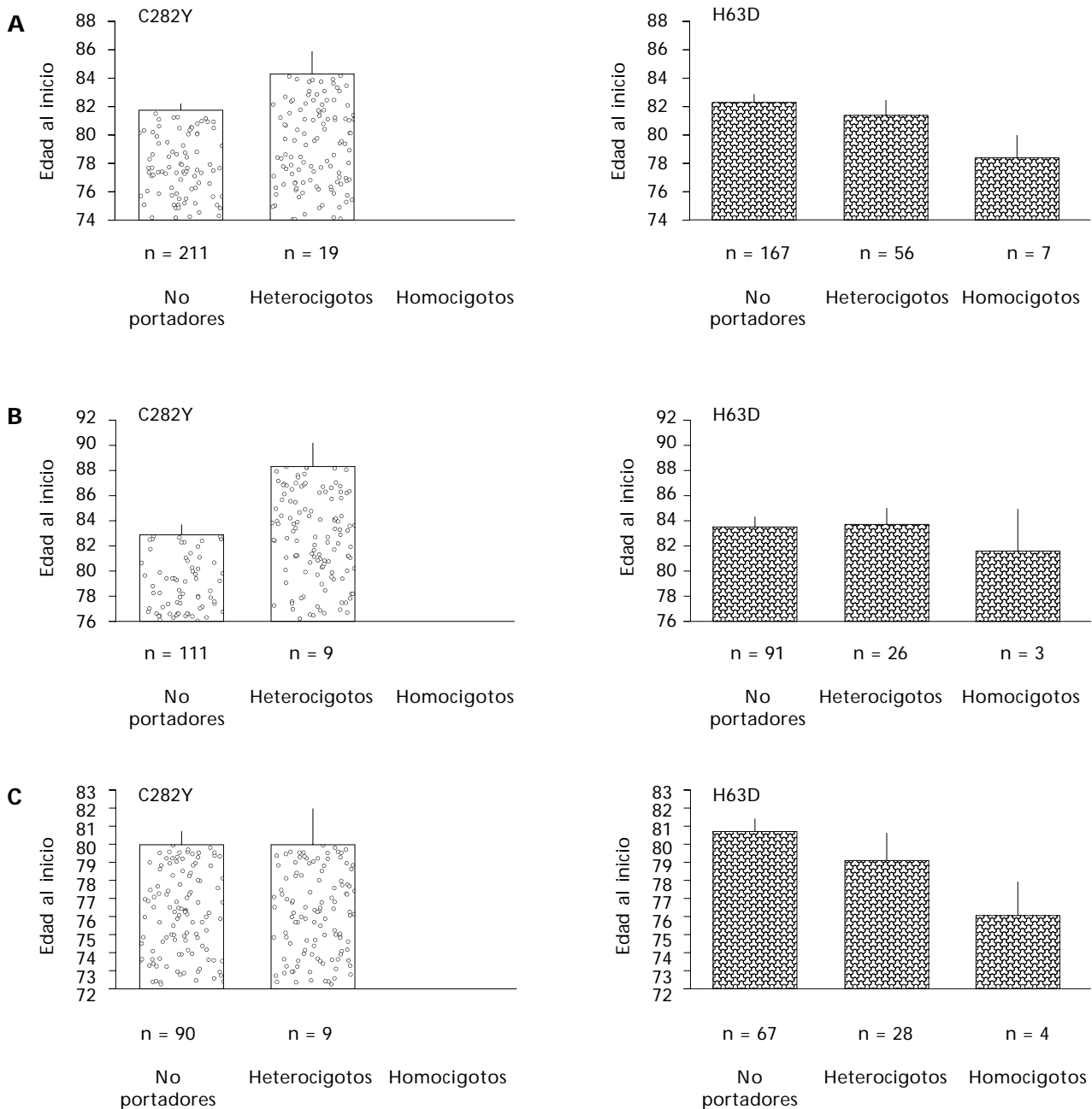


Figura 1. Edad promedio al inicio (años) en (A) el total de pacientes de EA incidente, (B) en no portadores *APOEε4* y (C) en portadores *APOEε4*. Las barras representan el error estándar del promedio.

La frecuencia de sujetos que fueron portadores de *APOEε4* y heterocigotos para las mutaciones *HFE* fue significativamente más alta en pacientes (17.5%) comparada a la de los controles (10.0%; RM 3.2; IC 95% 0.9-6.0; $p < 0.001$). En mujeres, la frecuencia de los que fueron portadores para *APOEε4* y heterocigotos para las mutaciones *HFE* fue más alta en los pacientes con EA (19.3%) comparada a la de los controles (9.8%; RM 3.8; IC 95% 2.0-7.3; $p < 0.001$). Sin embargo, esta diferencia no fue observada en los hombres.

DISCUSIÓN

En un estudio prospectivo nosotros observamos un pequeño aumento en el riesgo de EA en los homocigotos H63D comparado a los no portadores H63D, particularmente en aquellos que fueron portadores de las variantes *APOEε4*, el cual alcanzó un nivel significativo en los hombres. En contraste, observamos que la heterocigocidad para la mutación C282Y significativamente disminuyó el riesgo de EA. También observamos una edad más temprana de inicio de la enfermedad con el número de las

Tabla 3
Interacción entre portadores *HFE*, *APOEε4* y enfermedad de Alzheimer incidente

<i>HFE</i>	<i>APOEε4</i>	Controles N (%)	EA N (%)	Razón de momios (IC 95%) No ajustado	Razón de momios (IC 95%) Ajustado*
Total					
No	No	850 (46.3)	83 (39.3)	Referencia	Referencia
Sí	No	461 (25.1)	33 (15.6)	0.7 (0.5-1.1)	0.7 (0.4-1.1)
No	Sí	342 (18.6)	58 (27.5)	1.7 (1.2-2.5) ^a	2.5 (1.5-3.8) ^a
Sí	Sí	184 (10.0)	37 (17.5)	2.0 (1.3-3.1) ^a	3.2 (1.9-5.4) ^a
Hombres					
No	No	404 (45.6)	29 (31.1)	Referencia	Referencia
Sí	No	234 (26.4)	12 (19.7)	1.0 (0.5-2.3)	0.9 (0.4-2.1)
No	Sí	156 (17.6)	22 (36.1)	3.0 (1.6-5.7) ^a	3.3 (1.6-6.8) ^a
Sí	Sí	91 (10.3)	8 (13.1)	1.9 (0.8-4.4)	2.3 (0.9-6.0)
Mujeres					
No	No	446 (46.8)	64 (42.7)	Referencia	Referencia
Sí	No	227 (23.8)	21 (14.0)	0.6 (0.4-1.1)	0.6 (0.3-1.1)
No	Sí	186 (19.5)	36 (24.0)	1.3 (0.9-2.1)	2.1 (1.2-3.7) ^b
Sí	Sí	93 (9.8)	29 (19.3)	2.2 (1.3-3.5) ^a	3.8 (2.0-7.3) ^a

APOEε4: portadores de una o dos copias del alelo *APOEε4*.

Portadores *HFE*: heterocigocidad para las mutaciones H63D o C282Y.

* Ajustado para edad. a. $p \leq 0.01$. b. $p < 0.05$.

mutaciones, lo cual alcanzó un nivel significativo en hombres que fueron heterocigotos para la mutación H63D. No observamos algún aumento significativo en la mortalidad por las mutaciones *HFE* en los pacientes con EA.

Las ventajas de nuestro estudio son el tamaño de la muestra, el diseño longitudinal y su base poblacional, con un seguimiento completo de la incidencia de EA y de la mortalidad de todos los sujetos en riesgo. Más aún, este estudio tiene menor tendencia a un sesgo de selección y de información. Nosotros activamente examinamos para demencia, lo cual previno un sesgo por diferencias en la utilización de servicios de salud y las características de los participantes fueron establecidas antes del inicio del diagnóstico de demencia, minimizando el sesgo de memoria. El sesgo diagnóstico es poco probable en nuestro estudio. Los sujetos con bajas capacidades cognitivas de larga vida pueden haber sido diagnosticados de padecer demencia erróneamente. Estas personas fueron diagnosticadas como casos prevalentes y de ésta manera fueron excluidas del análisis. Una alta sensibilidad y especificidad de los procedimientos diagnósticos fueron aseguradas por el trabajo diagnóstico de tres fases. Hay un pequeño lugar para un sesgo de supervivencia en nuestro estudio debido a que no observamos una mortalidad diferencial por las mutaciones *HFE* en los pacientes de EA incidente. Debido a que restringimos nuestro estudio a pacientes que

fueron diagnosticados de padecer EA clínicamente definitiva y excluimos otros tipos de demencia y al hecho de que la genotipificación fue hecha ciega a la información clínica de los participantes, una mala clasificación de EA o de los genotipos pueden ser excluidas. Debido a que la edad está fuertemente asociada con comorbilidad, un sesgo puede ser introducido en la estimación del efecto sobre la EA. En contraste a los pacientes prevalentes, las series de casos incidentes de EA son menos probable de tener un sesgo por diferencias y selección debido a mortalidad.

La mutación C282Y *HFE* estuvo pobremente representada en nuestros pacientes y en los sujetos controles. Portar dos copias de la mutación H63D puede representar una ventaja selectiva a la susceptibilidad para EA en la edad tardía. En el estudio conducido por Sampietro M y cols. (2001)²⁰ en 107 pacientes italianos con EA esporádica no hubo alguna asociación clara de la mutación H63D *HFE* sobre la susceptibilidad para EA. En dicho estudio aquellos que fueron heterocigotos u homocigotos para el alelo H63D *HFE* tuvieron un inicio de la enfermedad más temprana comparada a la de aquellos que fueron homocigotos para el alelo tipo "wild", sin alguna diferencia relacionada al sexo. El genotipo *APOE* no modificó este efecto. En paralelo, en un estudio más grande hecho por Combarros O y cols. (2003)²² en 328 pacientes españoles con EA esporádica, la mutación H63D *HFE* estuvo

asociada con una edad de inicio más temprana sólo interactivamente con el alelo *APOEε4*. Nosotros hemos confirmado, ya que el genotipo *APOE* está asociado con EA.³⁰ Nuestros datos pueden sugerir una interacción entre *APOE* y *HFE*, ya que la incidencia de EA en presencia de *APOEε4* fue particularmente marcada en los homocigotos para la mutación H63D. Los otros hallazgos estuvieron en línea con los nuestros donde observamos una disminución en la edad de inicio solamente en portadores de la mutación H63D. La disminución en la edad de inicio fue más pronunciada en los homocigotos H63D que fueron portadores del alelo *APOEε4*, sugiriendo también un efecto sinérgico. En contraste, nosotros observamos que los heterocigotos C282Y mostraron un efecto protector significativo, así como una edad mayor al inicio. Esto puede ser debido a un aumento en la frecuencia de heterocigotos C282Y en los sujetos controles. Nuestro grupo control consistió no sólo de individuos sanos, sino también de personas con enfermedades diferentes, lo que puede ser la causa por la cual aumentó la frecuencia de heterocigotos C282Y si estuviera asociada con una o más de estas condiciones de enfermedad. La edad de los pacientes con EA fue significativamente mayor y esto puede aumentar falsamente la edad al inicio en los heterocigotos C282Y si esta mutación no está asociada con EA. En un análisis de casos y controles apareados por edad nosotros observamos que el riesgo para EA no fue diferente en los heterocigotos C282Y (datos no mostrados). Sin embargo, el efecto protector de la mutación C282Y fue confirmada por la observación que los heterocigotos C282Y tuvieron un volumen hipocámpal mayor comparado al de los no portadores (datos no mostrados). Sin embargo, la asociación inversa de los heterocigotos C282Y con la susceptibilidad para EA o con la edad de inicio requiere mayor investigación. En contraste, ninguna asociación fue encontrada entre las mutaciones *HFE* y EA en el estudio reciente practicado por otro grupo italiano.²¹ Ningún estudio investigó la relación entre las mutaciones *HFE* y la mortalidad en EA. Las diferencias observadas son más probablemente debidas no sólo a diferencias metodológicas, incluyendo un número bajo de sujetos, no respuesta, sesgos de diagnóstico y de memoria y mortalidad competitiva en el anciano, sino también a la comorbilidad presente a una edad mayor. Los estudios de casos y controles genéticos son notorios por sus hallazgos inconsistentes, pero igualmente importantes como aproximación de genes candidatos.³¹ Hasta la fecha éste es el primer estudio basado en población en el cual fueron estudiados pacientes de EA incidente y su mortalidad.

Los determinantes más importantes de EA son la edad avanzada y la susceptibilidad genética. En células cerebrales de EA la acumulación de hierro es vista como una fuente importante de radicales libres y un contribuyente al estrés oxidativo y a eventos inflamatorios, como mecanismos potenciales de daño, en la patogénesis o progresión de la EA.^{7,9,10} La relación del metabolismo alterado de hierro y EA ha sido apoyada en varias líneas de evidencia patológica y experimental.^{7,9,10,32-34} Adicionalmente, ha sido sugerido que genes múltiples controlan la distribución de hierro en el cerebro y en el sistema nervioso, además de la posibilidad de mecanismos de control del hierro particulares para el cerebro.³⁵ La proteína *HFE* ha sido localizada en células endoteliales vasculares y en células esparcidas en la corteza y cerebelo,³⁶ pero hasta ahora la función de ella en el cerebro es poco clara.^{9,34} El estado mutante de heterocigocidad y/o de homocigocidad *HFE* parece contribuir a un depósito excesivo de hierro y a un daño oxidativo potenciado por la generación de radicales libres en el cerebro de pacientes con EA. La mutación H63D ha sido asociada con un estado histopatológico avanzado en el tejido cerebral de pacientes con EA,¹⁸ con un aumento en el riesgo para EA y una edad de presentación más temprana de la enfermedad.

Nuestros datos sobre la relación entre H63D y *APOE* no son concluyentes. A pesar de ello, dado los hallazgos de otros y los nuestros, la mutación H63D puede contribuir no solamente a la susceptibilidad para EA, particularmente en portadores del alelo *APOEε4*, sino también puede anticipar la presentación clínica de la enfermedad. El efecto de la mutación C282Y *HFE* sobre el riesgo de EA permanece no resuelto y otros estudios longitudinales son necesarios.

RECONOCIMIENTO

Este estudio fue apoyado por la "Netherlands Organization for Scientific Research" (NOW), el "NESTOR Stimulation Program for Geriatric Research" en los Países Bajos (Ministry of Health and Ministry of Education) y la Municipalidad de Rotterdam. Agradecemos a J Vergeer, W Luijten por la genotipificación *HFE* y al Dr. HJM Smeets por proveer las muestras de referencia.

REFERENCIAS

1. Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, Hofman A. Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. *The Rotterdam Study*. *BMJ* 1995; 310: 970-3.
2. Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Stijnen T, Hofman A. Incidence and risk of dementia. *The Rotterdam Study*. *Am J Epidemiol* 1998; 147:574-580.

3. Ruitenbergh A, Ott A, van Swieten JC, Hofman A, Breteler MM. Incidence of dementia: does gender make a difference? *Neurobiol of Aging* 2001; 22: 575-80.
4. Holmes C. Genotype and phenotype in Alzheimer's disease. *Br J of Psych* 2002; 180: 131-4.
5. St. George-Hyslop PH. Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 924: 1-7.
6. Richard F, Amouyel P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharm* 2001; 412: 1-12.
7. Bishop GM, Robinson SR, Liu Q, Perry G, Atwood CS, Smith MA. Iron: a pathological mediator of Alzheimer disease? *Dev Neurosci* 2002; 24: 184-7.
8. Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VMY, Trojanowski JQ. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1264-75.
9. Sipe JC, Lee P, Beutler E. Brain iron metabolism and neurodegenerative disorders. *Dev Neurosci* 2002; 24: 188-96.
10. Smith MA, Perry G. Free radical damage, iron, and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1995; 134: 92-4.
11. Kala SV, Hasinoff BB, Richardson JS. Brain samples from Alzheimer's patients have elevated levels of loosely bound iron. *Int J Neurosci* 1996; 86: 263-9.
12. Smith MA, Harris PI, Sayre LM, Perry G. Iron accumulation in Alzheimer's disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9866-8.
13. Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman PJ, Schatzman RC. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1472-7.
14. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJH. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet* 1997; 34: 275-8.
15. Njajou OT, Houwing-Duistermaat JJ, Osborne RH, Vaessen N, Vergeer J, Heeringa J, Pols HA, Hofman A, van Duijn CM. A population-based study of the effect of the HFE C282Y and H63D mutations on iron metabolism. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 225-31.
16. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Wolff RK, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399-408.
17. Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *New Engl J Med* 1999; 341: 718-4.
18. Pulliam JF, Jennings CD, Kryscio RJ, Davis DG, Wilson D, Montine TJ, Schmitt FA, Markesbery WR. Association of HFE mutations with neurodegeneration and oxidative stress in Alzheimer's disease and correlation with APOE. *Am J Med Genet* 2003; 119B: 48-53.
19. Moalem S, Percy ME, Andrews DF, Kruck TPA, Wong S, Dalton AJ, Mehta P, Fedor B, Warren A. Are hereditary hemochromatosis mutations involved in Alzheimer's disease? *Am J Med Genet* 2000; 93: 58-66.
20. Sampietro M, Caputo L, Cassata A, Meregalli M, Pellagatti A, Tagliabue J, Andoni G, Vergani C. The hemochromatosis gene affects the age of onset of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 563-8.
21. Candore G, Licastro F, Chiappelli M, Franceschi C, Lio D, Balistreri CR, Piazza G, Colonna-Romano G, Grimaldi LM, Caruso C. Association between the HFE mutations and unsuccessful ageing: a study in Alzheimer's disease patients from Northern Italy. *Mech Ageing Dev* 2003; 124: 525-8.
22. Combarros O, García-Román M, Fontalba A, Fernández-Luna JL, Llorca J, Infante J, Berciano J. Interaction of the H63D mutation in the hemochromatosis gene with the apolipoprotein E epsilon 4 allele modulates age at onset of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2003; 15: 151-4.
23. Hofman A, Grobbee DE, De Jong PTVM, van den Ouweland FA. Determinants of disease and disability in the elderly: the Rotterdam Elderly Study. *Eur J Epidemiol* 1991; 7: 403-22.
24. Roth M, Hupport FA, Tym E, Mountjoy CQ. CAMDEX, the Cambridge examination for mental disorders of the elderly. Cambridge University Press, 1988.
25. American Psychiatric Association. *Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorder. Third Edition, Revised.* Washington, DC. American Psychiatric Association, 1987.
26. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34: 939-44.
27. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
28. Wenham PR, Price WH, Blundell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet* 1991; 337: 1158-9.
29. Terwilliger JD, Ott J. *Handbook of human genetic linkage.* New York: John Hopkins University Press; 1994, p. 307.
30. Slooter AJ, Cruts M, Kalmijn S, Hofman A, Breteler MM, van Broeckhoven C, van Duijn CM. Risk estimates of dementia by apolipoprotein E genotypes from a population-based study: the Rotterdam Study. *Arch Neurol* 1998; 55: 964-8.
31. Finckh U. The future of genetic association studies in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2003; 110: 253-66.
32. Campbell A, Smith MA, Sayre LM, Bondy SC, Perry G. Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 2001; 55: 125-32.
33. Thompson KJ, Shoham S, Connor JR. Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull* 2001; 55: 155-64.
34. Rouault TA. Systemic iron metabolism: a review and implications for brain iron metabolism. *Ped Neurol* 2001; 25: 130-7.
35. Lieu PT, Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. The roles of iron in health and disease. *Mol Asp Med* 2001; 22: 1-87.

36. Bastin JM, Jones M, O'Callaghan CA, Schimanski L, Mason DY, Townsend AR. Kupffer cell staining by an HFE-specific

monoclonal antibody: implications for hereditary haemochromatosis. *Br J Haematol* 1998; 103: 931-41.

