

Enfermedad de Alzheimer: deterioro cognitivo y funcional asociado a polimorfismos de APOE y A2M

Fariñas, F.; Sastre, I.*; Gil Gregorio, P. y Bullido, M. J.*

Servicio Geriatría. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.* Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa».

RESUMEN

OBJETIVOS: Los objetivos de este estudio fueron los siguientes: 1. Estudiar el riesgo de enfermedad de Alzheimer (EA) asociado a polimorfismos en los genes APOE y A2M, en un estudio de comparación caso-control. y 2. Estudiar la posible relación genotipo/fenotipo de los genes APOE y A2M con la EA, analizando el efecto de los polimorfismos sobre la edad de comienzo y la evolución de los síntomas de la EA en la muestra de pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se incluyeron en el estudio 145 personas mayores de 65 años, estudiadas en el Servicio de Geriatría del Hospital Clínico de San Carlos. Se estableció un grupo control (individuos sin deterioro cognitivo) constituido por 73 individuos, y un grupo con diagnóstico de EA probable (según criterios NINCDS-ADRA) sin asociación familiar, de 72 pacientes. Todos ellos fueron valorados cognitivamente mediante la aplicación del Mini Examen Cognitivo (MEC) y el apartado cognitivo del CAMDEX (CAMCOG). El estadio evolutivo de la enfermedad se asignó mediante la escala FAST. Como índices de progresión de la enfermedad se utilizaron las razones FAST/tiempo de evolución y [decremento CAMCOG]/tiempo. Se realizó una extracción de DNA genómico de muestras de sangre para determinar el genotipo ApoE, realizar el análisis mutacional del promotor y primer intrón del mismo gen, y estudiar la presencia de la delección en A2M.

RESULTADOS: En cuanto al estudio de riesgo, encontramos que un 21% de los pacientes presentaban el alelo ε4, frente a un 6,2% en el grupo control, y un riesgo significativo de EA asociado a este alelo. No encontramos diferencias significativas entre casos y controles en la distribución de alelos de los polimorfismos del promotor APOE ni del polimorfismo de delección de cinco pares de bases en el exon 8 de A2M, aunque sí se observaron ligeras tendencias a la asociación en los polimorfismos -491 A/T y -219 T/G del promotor APOE.

El estudio de la correlación genotipo fenotipo mostró que: a) De acuerdo con lo descrito en otros estudios, el alelo ε4 se asociaba a una edad de comienzo de síntomas (ECS) más precoz que ε3 y ε2, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística y b) El polimorfismo -219 T/G del promotor APOE parece estar asociado con la agresividad de la EA; concretamente, el genotipo -219 GG se asoció a una edad de comienzo de la enfermedad muy tardía (> 75 años) en el 88,2% de los casos ($p < 0,001$), y a una progresión lenta de la enfermedad (70,6%, $p < 0,001$).

Correspondencia: P. Gil Gregorio. Servicio de Geriatría. Hospital Clínico San Carlos. Prof. Martín Lagos, s/n. 28040 Madrid.

Recibido el 29-11-00; aceptado el 8-02-02.

CONCLUSIONES: Dada la frecuencia de la variante APOE -219GG en la población general (aproximadamente un 32% de homozigotos) y su asociación con formas de comienzo muy tardío y de evolución lenta de EA, su utilización como marcador genético en la EA esporádica podría ser de utilidad clínica.

Palabras clave

Enfermedad de Alzheimer. Demencia. APOE. A2M. Polimorfismo. Promotor.

Alzheimer's disease. Cognitive and functional deterioration associated to polymorphisms and APOE and A2M

SUMMARY

OBJECTIVES: The objectives of this study are the following: 1. Study the risk of Alzheimer's disease (AD) associated to polymorphisms in the APOE and A2M genes in a case-control comparison study and 2. Study the possible genotype/phenotype relationship of the APOE and A2M genes with AD, analyzing the effect of the polymorphisms on the age of onset and evolution of the AD symptoms in the patient sample.

MATERIAL AND METHODS: 145 persons over 65 years, studied in the Geriatrics Service of the «Hospital Clínico of San Carlos» were included in the study. A control group (individuals without cognitive deterioration, made up of 73 subjects, and a group with the diagnosis of probable AD (according to the NINCDS-ADRA criteria) without family association made up of 72 patients were established. All of them were assessed cognitively with the Mini Mental State Examination (MMSE) and the cognitive section of the CAMDEX (CAMCOG). The evolutive stage of the disease was assigned with the FAST scale. As disease progression indexes, the FAST/evolution and [CAMCOG decrease]/time ratios were used. An extraction of genomic DNA from blood samples was performed to determine the genotype ApoE, perform the mutational analysis of the promoter and first intron of the same gene and study the presence of the deletion in A2M.

RESULTS: In regards to the study of risk, we found that 21% of the patients presented allele ε4 compared to 6.2% in the control group and a significant risk of AD associated to this allele. We found no significant differences between cases and controls in the distribution of alleles of the polymorphisms of the APOE promoter or of the polymorphism of deletion of 5 base pairs in exon 8 of A2M, although slight tendencies to the association in the polymorphisms -491 A/T and -219 T/G of the APOE promoter were observed.

The study of the genotype-phenotype correlation showed that: a) according to that described in other studies, allele $\epsilon 4$ was associated to an earlier age of onset of the symptoms (AOS) than $\epsilon 3$ and $\epsilon 2$, although the differences did not reach statistical significance and b) the polymorphism -219 T/G of the APOE promoter seems to be associated with the aggressivity of the AD; specifically the genotype -219 GG was associated to the onset age of the very late disease (>75 years) in 88.2% of the cases ($0 < 0.001$) and a slow progression of the disease (70.6%, $p < 0.001$).

CONCLUSIONS: Given the frequency of the APOE -219GG variant in the general population (approximately 32% of homozygotes) and its association with very late onset forms and slow evolution of AD, its use as a genetic marker in the sporadic AD could be clinically useful. Key words: Alzheimer's disease, dementia, APOE, A2M, Polymorphism, Promotor

Key words

Alzheimer's disease. Dementia. APOE. A2M. Polymorphism. Promotor.

INTRODUCCIÓN

La identificación de genes que pueden influir en determinados rasgos biológicos y conductuales (fenotípicos) en individuos con deterioro cognitivo puede aportar información muy valiosa sobre la alteración cognitiva en sí misma, y sobre su evolución o historia natural.

Los estudios genéticos realizados durante la última década sobre la enfermedad de Alzheimer (EA) han revelado que se trata de una afección heterogénea, en la que se han identificado dos tipos de transmisión hereditaria¹: a) En una pequeña proporción ($< 5\%$) de los casos se confirma una herencia mendeliana pura, autosómica dominante; estas formas se caracterizan, además de por su agregación familiar (EAF), por el comienzo precoz de los síntomas (generalmente inferior a 60-65 años). El análisis genético de estas familias ha permitido la identificación de tres loci implicados en la patogenia de la EA: la proteína precursora del amiloide β (PPA β), y las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2). b) La mayoría de los casos no se ajusta a un patrón mendeliano, aunque el riesgo de desarrollar la enfermedad está incrementado en familiares en primer grado de afectos; esta forma de EA, denominada esporádica o compleja, parece ser una enfermedad condicionada polígenicamente, y/o el producto de interacciones complejas gen-entorno.

El gen de la apolipoproteína E (APOE, OMIM Entry: 107741) es el factor genético más relevante de los descriptos hasta la fecha como factor de susceptibilidad para la EA esporádica^{2,3}. Además de éste, los estudios de ligamiento genético indican la existencia de varios genes implicados en la EA^{4,5}. De ellos, el más estudiado ha sido el de la α -2-macroglobulina (A2M, OMIM Entry: 103950)^{6,7}.

El producto del gen APOE (apolipoproteína E; apoE) es una proteína monomérica constituida por 299 residuos aminoacídicos. Es el principal componente de diversas especies de lipoproteínas plasmáticas que intervienen en

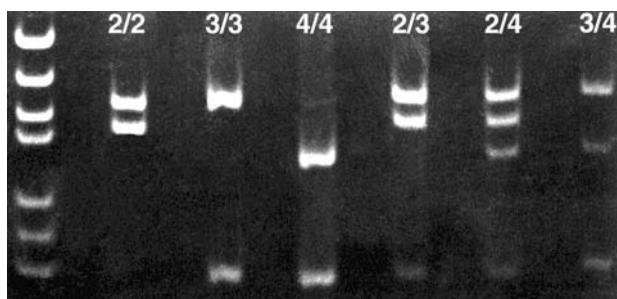


Figura 1. Gel de Agarosa mostrando genotipos ApoE.

el transporte y metabolismo del colesterol y triglicéridos, a través de su interacción con receptores de lipoproteínas. Se sintetiza principalmente en hígado, aunque también en glándulas suprarrenales y sistema nervioso, principalmente en procesos de regeneración^{8,9}. En el cerebro se ha demostrado su expresión preferente por células gliales y subpoblaciones de neuronas corticales e hipocampo⁹. Diversos experimentos con animales transgénicos han confirmado su implicación en funciones de reparación y mantenimiento neuronal^{10,17}, refrendando el papel que se le había asignado en los estudios anatopatológicos de casos de lesión cerebral^{17,20}. Las tres principales isofomas de la ApoE humana (E2, E3, E4) están codificadas por tres alelos del gen, y difieren en los residuos 112 y 158. La variante más común del gen es la $\epsilon 3$ (codifica Cys112-Arg158; frecuencia referida a todos los alelos en caucasianos $f = 75-85\%$), seguida de $\epsilon 4$ (Arg112-Arg158; $f = 6-15\%$) y $\epsilon 2$ (Cys112-Cys158; $f = 5-7\%$) (Cys = cisteína, Arg = arginina)²¹ (fig. 1). La expresión de dos de los tres alelos en cada individuo en concreto, resulta en seis genotipos presentes en la población: $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$. Estudios caso-control de EA de comienzo tardío (tanto en su forma esporádica como familiar) han demostrado consistentemente que: a) la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ está incrementada en estos pacientes (45%)²², b) la frecuencia del alelo $\epsilon 2$ está disminuida^{23,24} aunque esta observación no es tan generalizada como la anterior, c) existe una relación entre el número de copias de $\epsilon 4$ y la edad de comienzo de los síntomas (ECS), de tal forma que en los homozigotos $\epsilon 4/\epsilon 4$ la enfermedad se manifiesta muy precozmente (comienzo de los síntomas aproximadamente 68 años)^{25,26} y d) el efecto del alelo $\epsilon 4$ se modula por factores relacionados con la edad, siendo este efecto relativamente modesto en individuos que alcanzan los 80-85 años sin síntomas de deterioro.

La asociación entre EA y APOE $\epsilon 4$ ha sido confirmada sobre diversos grupos étnicos por numerosos grupos de investigación²⁷, aunque también se han encontrado algunas excepciones. Se ha descrito un mayor riesgo asociado a APOE en mujeres que en hombres (dos veces mayor en heterozigotos), aunque estos datos no están confirmados en todos los estudios^{28,29}. Los estudios realizados en población española revelan frecuencias de $\epsilon 4$ menores que en otras poblaciones caucasianas (6% frente al 15%)^{30,31}; dado que la frecuencia en los pacientes es si-

milar a la de los otros países, el alelo $\epsilon 4$ de APOE confiere en las muestras españolas un mayor riesgo relativo (RR, valores referidos a $\epsilon 3$; RR ($\epsilon 4$) = 2,7-2,9) para desarrollar EA de comienzo tardío^{30,31}.

Recientemente se han descubierto varios polimorfismos en el promotor de APOE (los más estudiados en las posiciones -491, -427, -219) y en el primer intrón (+113), que también se han asociado a un mayor riesgo de padecer EA³²⁻³⁵. Los estudios realizados indican que el riesgo es debido a cambios en la actividad transcripcional del gen^{32,34}, que se traducen en diferencias en los niveles de la proteína en humanos^{36,37}. La réplica en diversas muestras ha producido resultados contradictorios³⁸⁻⁴⁹, aunque lo que sí parece estar claro que los niveles de apoE son relevantes para la EA³⁸.

La α -2 macroglobulina (A2M) es una inhibidora sérica de proteasas, que ha sido relacionada con la EA a través de su capacidad para mediar el aclaramiento y degradación del amiloide- β (A β) que se deposita en las placas seniles. El gen de la A2M (cromosoma 12p13.3-p12.3)⁵⁰⁻⁵² está presente en copia única en el genoma haploide⁵³. Blacker et al, analizaron una delección en el sitio de procesamiento por corte y empalme 5' del exón II de la región «cebo» (exón 18), denominada A2M-27, encontraron un riesgo incrementado para EA (RR = 3,56). Diversos autores han refrendado estos hallazgos⁵⁴, aunque otros no han encontrado asociación alguna entre este polimorfismo y la EA⁵⁵⁻⁵⁷.

En este contexto, los objetivos básicos de este estudio fueron dos: 1) Analizar las diferencias entre una población anciana sin deterioro cognitivo y otra con diagnóstico de EA esporádica, desde el punto de vista de su dotación alélica para APOE y A2M; y 2) valorar si algunos rasgos clínicos de los pacientes con EA se relacionan con sus correspondientes perfiles genéticos (estudio genotípico-fenotípico).

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos de estudio

El estudio se realizó con pacientes que acuden a las consultas externas del Servicio de Geriatría del Hospital Clínico San Carlos. La muestra estaba compuesta por 145 personas con edades comprendidas entre 66 y 109 años, de los cuales el 58,6% eran mujeres. Todos los participantes y/o sus familiares fueron informados del propósito de este estudio, otorgando su consentimiento. Se establecieron dos grupos de estudio:

1. *Grupo control.* Compuesto por 73 personas mayores de 65 años, con una edad media de $87,8 \pm 10,1$ años que no presentaban manifestaciones clínicas de deterioro cognitivo.

2. *Grupo EA.* En este grupo se incluyeron los pacientes que cumplían criterios clínicos de demencia DSM-IV⁵⁸ y fueron clasificados como EA probable según criterios NINCDS-ADRDA⁵⁹. Se seleccionaron los casos esporádicos (sin agregación familiar) con ECS igual o superior a 65 años. La muestra estaba compuesta por 72 pacientes, con una edad media de $83,9 \pm 10,7$ años.

Valoración clínica. Criterios de inclusión/exclusión. Estratificación de la muestra

En ambos grupos se recogieron datos sobre edad, sexo, nivel de escolarización, presencia de enfermedades, historia farmacológica, exploración física y neurológica, y análisis sistemático de sangre. Se realizó una primera valoración cognitiva mediante el Mini Examen Cognoscitivo de Lobo et al (MEC)^{60,61}, para posteriormente aplicar el apartado cognitivo CAMCOG del CAMDEX⁶². La valoración de la dependencia funcional se realizó mediante el índice de actividades básicas de la vida diaria de Katz⁶³. El estadio evolutivo de la demencia se asignó mediante la *Functional Assessment Staging* de Reisberg (FAST)⁶⁴. La existencia de trastornos psicológicos y conductuales se recogió mediante el Inventario Neuropsiquiátrico de Cummings (NPI)⁶⁵. Se realizó exploración de neuroimagen estructural y funcional mediante CT y SPECT, respectivamente. Se excluyeron del estudio los individuos (tanto pertenecientes al grupo control como los EA) cuya CT reflejaba imágenes compatibles con lesiones isquémicas. Con relación al SPECT cerebral todos los pacientes con demencia presentaban un patrón de hipoperfusión temporo-parietal bilateral. Aquellos pacientes con hipoperfusión asimétrica o de predominio anterior también fueron excluidos del estudio.

Se estableció la categoría precoz en la edad de comienzo de los síntomas (ECS) para aquellos pacientes en los que los síntomas comenzaron antes de los 75 años, y la tardía cuando las primeras manifestaciones clínicas ocurrieron después de los 75 años.

Como índices de progresión de la enfermedad se establecieron:

1. *Razón FAST/tiempo de evolución (F/T).* Se estableció que una evolución rápida ocurría cuando el cociente F/T era superior a 0,15; y que en una evolución lenta el índice era inferior o igual a 0,15.

2. *Razón decremento CAMCOG/tiempo de evolución (C/T).* Cuando el cociente C/T era superior o igual a 1,5 los pacientes se clasificaron como portadores de una forma evolutiva rápida; en caso contrario se consideró una evolución lenta.

El índice C/T ha sido utilizado por algunos autores con el mismo fin⁶⁶. No obstante, ninguno de los dos ha sido convenientemente validado, aunque creemos que ofrecen una información veraz sobre la progresión de la enfermedad cuando se utilizan en grupos bastante homogéneos.

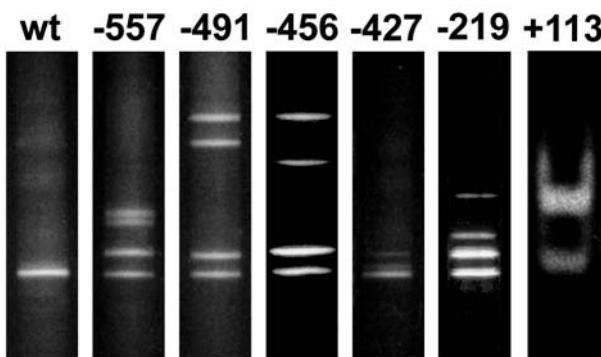


Figura 2. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante mostrando polimorfismos del promotor de ApoE.

Análisis genético

En todos los pacientes se procedió a la obtención de muestras de sangre (20-30 ml) mediante punción de una vena antebraquial, empleando dispositivos comerciales de extracción con EDTA como anticoagulante. Todas las extracciones se realizaron entre las 9:00 y las 10:00 a.m., tras un período de ayuno mínimo de seis horas.

El ADN genómico se obtuvo a partir de sangre con el kit comercial Nucleospin Blood de Contech, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El ADN se utilizó como molde para amplificar las regiones polimórficas a estudiar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El genotipado se realizó en todos los casos según métodos descritos previamente, por digestión con enzimas de restricción (RFLP) o por electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE). Brevemente: el genotipo ApoE (determinación de los alelos

2/3/4) se determinó por digestión con la enzima de restricción Hhal, según el método descrito en⁶⁷. El genotipo correspondiente a los sitios polimórficos del promotor y primer intrón de APOE (-491 A/T, -427 T/C, -219 T/G y +113 G/C), se determinó por DGGE y RFLP como se describe en 31-33 (fig. 2). El análisis de la delección de 5 pb en el exón 8 de A2M se realizó según el procedimiento descrito por Álvarez et al⁵⁴, por digestión con Ddel.

Estadística

Los datos fueron recogidos en una base de datos informática. El análisis se realizó mediante un paquete estadístico comercial (Programa SPSS). Se fijaron intervalos de confianza al 95%. Para las variables cuantitativas se realizaron contrastes mediante t-test y ANOVA, previa comprobación de la bondad de ajuste a la normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov). La asociación entre variables cualitativas se contrastó mediante la prueba de ji-cuadrado o la prueba exacta de Fisher, en su caso.

RESULTADOS

La tabla 1 recoge los datos generales de valoración cognitiva, funcional y psicológica conductual de los dos grupos, control y EA, sin estratificar y estratificados por sexo (H, hombres; M, mujeres).

Puede observarse la elevada edad media tanto en el grupo control ($87,8 \pm 10,1$ años) como en el de EA ($83,9 \pm 10,7$ años). La mayoría de los pacientes se encontraban en un estadio evolutivo moderado (FAST 4-5 = 51,4% de los casos) al incorporarse al estudio. No se observó una alta frecuencia ni severidad de trastornos neuropsiquiátricos.

TABLA 1. Descripción general de la muestra. Las columnas encabezadas con H y M se refieren a hombres y mujeres, y corresponden a la columna situada a su izquierda (Control o EA, respectivamente). N total = 145.

	Control	Control H	Control M	EA	EA H	EA M
Edad media \pm DT (N; %)	$87,8 \pm 10,1$ (73; 50,3%)	$86,4 \pm 10,8$ (30; 41,1%)	$87,9 \pm 9,5$ (43; 58,9%)	$83,9 \pm 10,7$ (72; 49,7%)	$85,3 \pm 9,5$ (30; 41,7%)	$82,0 \pm 11,3$ (42; 58,3%)
Katz (N)	$3,2 \pm 1,8$ (71)	$2,8 \pm 1,8$ (30)	$3,6 \pm 1,7$ (41)	$4,1 \pm 2$ (68)	$4,3 \pm 2,2$ (27)	$3,9 \pm 1,9$ (41)
MMSE (N)	$26,7 \pm 4,5$ (73)	$26,8 \pm 4,3$ (30)	$26,6 \pm 4,8$ (43)	$16,3 \pm 7,9$ (72)	$15,7 \pm 7,6$ (30)	$16,6 \pm 8,2$ (42)
CAMCOG (N)	$69,1 \pm 10,4$ (73)	$70,9 \pm 11$ (30)	$67,7 \pm 9,8$ (43)	$41,7 \pm 23,0$ (70)	$37,8 \pm 21,7$ (28)	$44,2 \pm 23,8$ (42)
FAST (N)	$2,1 \pm 0,5$ (73)	$2,1 \pm 0,6$ (30)	$2,1 \pm 0,5$ (43)	$5,4 \pm 1,1$ (72)	$5,6 \pm 1,0$ (30)	$5,3 \pm 1,2$ (42)
NPI (N)	$0,5 \pm 1,9$ (57)	$0,6 \pm 2,3$ (24)	$0,4 \pm 1,7$ (33)	$10,2 \pm 9,0$ (62)	$11,1 \pm 8,7$ (23)	$9,7 \pm 9,2$ (39)

TABLA 2. Estratificación según forma de comienzo y evolución en los pacientes con EA. ECS precoz = Edad de comienzo de síntomas; evolución rápida = FAST/tiempo de evolución superior a 0,15 etapa/mes (alcanzar FAST 7 en cuatro años o menos, aproximadamente), evolución lenta si el índice es inferior a 0,15. Los porcentajes están referidos a la fila correspondiente.

	Evolución lenta	Evolución lenta - H	Evolución lenta - M	Evolución rápida	Evolución rápida - H	Evolución rápida - M	Total (N)
ECS < 75 años (N, %)	8 (28,6%)	3 (37,5%)	5 (25,0%)	20 (71,4%)	5 (62,5%)	15 (75,0%)	28
ECS \pm 75 años (N, %)	30 (68,2%)	13 (59,1%)	17 (77,3%)	14 (31,8%)	9 (40,9 %)	5 (22,7%)	44
Total (N)	38	16	22	34	14	20	72

P<0,001.

cos entre los pacientes (puntuación media NPI (EA) = $10,2 \pm 9,0$).

La relación entre la forma de comienzo y la tipología evolutiva de los pacientes con EA se representa en la tabla 2. La distribución de genotipos y alelos ApoE se representa en la tabla 3. No encontramos ninguna diferencia significativa al comparar las representaciones de los portadores de la delección en A2M (DN+ DD, D: alelo con delección; N: alelo sin delección) en el grupo EA y en los controles.

La distribución de genotipos del promotor y primer intrón de APOE en pacientes y controles no estratificados y estratificados por sexo, se representa en la tabla 4. No se encontró relación alguna entre el genotipo APOE y el grupo de evolución, pero sí con la forma de comienzo de los síntomas. El genotipo 4/4 se asociaba a un comienzo precoz (66,7% de los casos) y el 3/3 a formas tardías (65,1%). Respecto a los polimorfismos del promotor APOE, se observa una mayor frecuencia de los genotipos

-491AA (65,7 frente a 59,2 %), -219 TT (28,6 frente a 18,3%) y +113 GG (46,5 frente a 38,6%) en los pacientes respecto a los controles; aunque, probablemente debido al tamaño de la muestra, estas diferencias no alcanzaban la significación estadística.

El estudio del polimorfismo +113 del primer intrón de APOE parece indicar una asociación entre el genotipo C/C y las formas de comienzo tardío (72,7%). No obstante, el número reducido de pacientes con este genotipo no permite obtener conclusiones relevantes.

El análisis del polimorfismo -219 del promotor APOE mostró los resultados más interesantes en cuanto a su relación con la evolución de los síntomas. Estos resultados se muestran en la tabla 5. El genotipo -219GG se presenta en las formas de comienzo tardío en el 88% de los casos (p< 0,001), con una edad media de 84,4 años, y además el 70,6% de los pacientes con este genotipo presenta una forma evolutiva lenta (p< 0,001).

TABLA 3. Frecuencia de genotipos y alelos ApoE en la muestra caso-control. Se representa el número de individuos (N) y, entre paréntesis, el porcentaje referido al grupo (los totales de cada grupo se muestran en *italica*).

ApoE Genotipo	Todos		Hombres		Mujeres	
	Controles N (%)	Casos	Controles N (%)	Casos	Controles N (%)	Casos
2/2	—	—	—	—	—	—
2/3	8 (10)	4 (5,6)	3 (10)	3 (10,3)	5 (11,6)	1 (2,4)
2/4	—	2 (2,8)	—	—	—	2 (4,8)
3/3	57 (78)	43 (60,6)	24 (80)	11 (37,9)	33 (76,7)	32 (76,2)
3/4	7 (10)	16 (22,5)	3 (10)	11 (37,9)	4 (9,3)	5 (11,9)
4/4	1 (1)	6 (8,5)	—	4 (13,8)	1 (2,3)	2 (4,8)
Total	73	71	30	29	43	42
<i>Alelo</i>						
2	8 (5,5)	6 (4,2)	3 (5)	3 (5,2)	5 (5,8)	3 (3,6)
3	129 (88,3)	106 (74,6)	54 (90)	36 (62,1)	75 (87,2)	70 (83,3)
4	9 (6,2)	30 (21,1)	3 (5)	19 (32,7)	6 (7)	11 (13,1)
Total	146	142	60	58	86	84

TABLA 4. Frecuencia de genotipos de los polimorfismos del promotor y primer intrón de APOE. Los porcentajes están referidos al grupo, control o EA respectivamente (totales en itálica).

Genotipo	Todos		Hombres		Mujeres	
	Control N (%)	EA	Control	EA	Control	EA
-491						
AA	42 (59,2)	44 (65,7)	16 (53,3)	18 (64,3)	26 (60,4)	26 (66,7)
AT	24 (33,8)	23 (34,3)	11 (36,7)	10 (35,7)	13 (31,7)	13 (33,3)
TT	5 (7,0)	—	3 (10)	—	2 (4,9)	—
<i>Total</i>	<i>71</i>	<i>77</i>	<i>30</i>	<i>28</i>	<i>41</i>	<i>39</i>
-427						
TT	61 (85,9)	61 (89,7)	25 (86,2)	24 (85,7)	36 (85,7)	37 (92,5)
TC	10 (14,1)	7 (10,3)	4 (13,8)	4 (13,8)	6 (14,3)	3 (7,5)
CC	—	—	—	—	—	—
<i>Total</i>	<i>71</i>	<i>68</i>	<i>29</i>	<i>28</i>	<i>42</i>	<i>40</i>
-219						
TT	13 (18,3)	20 (28,6)	7 (24,1)	9 (31)	6 (14,3)	11 (26,8)
TG	35 (49,3)	33 (47,1)	18 (62,1)	13 (44,8)	17 (40,5)	20 (48,8)
GG	23 (32,4)	17 (24,3)	4 (13,8)	7 (24,1)	19 (45,2)	10 (24,4)
<i>Total</i>	<i>71</i>	<i>70</i>	<i>29</i>	<i>29</i>	<i>42</i>	<i>41</i>
+113						
GG	27 (38,6)	33 (46,5)	6 (20,7)	15 (51,7)	21 (51,2)	18 (42,9)
GC	33 (47,1)	27 (38,0)	17 (58,6)	9 (31)	16 (39)	18 (42,9)
CC	10 (14,3)	11 (15,5)	6 (20,7)	5 (17,2)	4 (9,8)	6 (14,3)
<i>Total</i>	<i>70</i>	<i>71</i>	<i>29</i>	<i>29</i>	<i>41</i>	<i>42</i>

DISCUSIÓN

Desde el punto de vista clínico en nuestro estudio se observó una relación entre los grupos de ECS y la forma de evolución, ya que la mayor parte (71%) de los pacientes con ECS< 75 años presentaba evolución rápida, mientras que la mayoría (68%) de los pacientes con ECS> 75 años presentaba evolución lenta.

En relación a la distribución de los alelos APOE se observó un aumento en la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en los pacientes respecto a los controles (21,1 y 6,2%, respectivamente), más acentuada en los hombres (32,7 frente a

5%), que en las mujeres (13,1 frente a 7%). Por tanto, en nuestra muestra se replica la asociación entre el alelo $\epsilon 4$ de ApoE y un mayor riesgo para la EA, pero no el hecho, observado en otros estudios, de que este efecto sea mayor en las mujeres. La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en los pacientes es inferior al obtenido en otros estudios en nuestro país (21,1% frente a 28% en el estudio de Adroer et al³⁰ y 34% en el de Bullido et al³¹), probablemente como consecuencia de que nuestra muestra está formada por individuos de mayor edad que las estudiadas en estos trabajos, y en línea con la observación de que el alelo $\epsilon 4$ presenta un efecto menor a partir de los 80-85 años²⁸.

TABLA 5. Manifestaciones clínicas (ECS y progresión) en función del polimorfismo -219 T/G del promotor APOE. Se representa el número de casos en cada grupo y, entre paréntesis, los porcentajes referidos a cada genotipo (totales en itálica). Una evolución rápida = FAST/tiempo de evolución superior a 0,15 etapa/mes supone alcanzar FAST 7 en cuatro años o menos.

APOE Genotipo	Edad de comienzo de los síntomas (ECS)			Evolución (etapas FAST/ tiempo meses)		
	Precoz < 75 años	Tardía ≥ 75 años	Total (N)	Rápida (< 0,15)	Lenta (≥ 0,15)	Total (N)
TT	9 (45%)	11 (55%)	20	11 (55%)	9 (45%)	20
TG	16 (48,5%)	17 (51,5%)	33	16 (48,5%)	17 (51,5%)	33
GG	2 (11,8%)	15 (88,2%)	17	5 (29,4%)	12 (70,6%)	17

De los datos expuestos, parece desprenderse una fuerte relación entre la gravedad de la enfermedad en los casos tardíos y esporádicos y la presencia de determinados polimorfismos del promotor de APOE. Esto sugiere una implicación en la patogenia de la enfermedad de la regulación transcripcional y/o procesamiento post-transcripcional del gen APOE.

El genotipo -219 GG se asocia a un comienzo tardío (superior a 75 años) y una evolución lenta (más de cinco años) para alcanzar FAST 7 desde el comienzo de los síntomas. Ello puede ser debido a que en esta posición del promotor o en sus cercanías radique un elemento de regulación, que modifique los niveles transcripcionales de APOE. En este sentido, recientemente se han descrito factores de transcripción con zonas de unión cercanas⁶⁸.

La fuerte asociación entre la variante GG de -219 (presente en un 32% en los controles) y una ECS superior a 75 años con una evolución lenta, permite, previa la extensión de este estudio a una muestra más amplia y la confirmación en otras muestras, pensar en su utilización como marcador genético de evolución en la EA esporádica y tardía.

En relación al polimorfismo +113 del primer intrón de APOE (genotipo C/C) y su posible relación con las formas de comienzo tardío, se conoce como APOE +113C está en desequilibrio de ligamiento con el alelo ApoE- ε3^{31,33} y, en consecuencia, no podemos descartar que el efecto del polimorfismo APOE +113 sea debido a dicho desequilibrio.

En nuestro estudio parece confirmarse la inexistencia de asociación entre la delección de 5 pb en el exon 18 de A2M y enfermedad de Alzheimer. Este resultado concuerda con otras publicaciones⁵⁵⁻⁵⁷. No obstante, es preciso restringir estas conclusiones a la población representada por nuestra muestra, aunque en un estudio realizado en nuestro país⁵⁴ encontraron que esta asociación puede estar afectada por la edad.

En cuanto al análisis de riesgo, observamos, de acuerdo con lo esperado, una mayor frecuencia del alelo ApoE ε4 en los pacientes, mientras que los resultados de los demás polimorfismos estudiados son más variables; estos resultados están en línea con el hecho de que, hasta el momento, ApoE4 es el único factor genético de susceptibilidad que es posible implicar sin controversias en la patogenia de la EA. Entre las múltiples causas a las que se podrían atribuir las discrepancias encontradas entre nuestros resultados y los de otros autores, cabe destacar el que en este estudio analicemos casos de EA con una edad de comienzo de los síntomas muy tardía, ya que hay bastantes indicios de que el efecto de estos polimorfismos puede variar en función del sexo y/o la edad^{38,54,68}.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se ha realizado con una beca de la Sociedad Española de Geriatría y Gerontología financiada por la empresa farmacéutica BAYER

BIBLIOGRAFÍA

1. Fariñas F. Genética y patología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2000;35:9-17.
2. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-affinity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:1977-81.
3. Saunders AM. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: an update on genetic and functional analyses. *J Neuropathol Exp Neural* 2000;59: 751-8.
4. Kehoe P, Warrant-De Vrieze F, Crook R, Wu WS, Holmans P, Fenton I, et al. A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1999;8:237-45.
5. Warwick Daw E, Payami H, Nemens EJ, Nochlin D, Bird TD, Schellenberg GD, et al. The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 2000;66:196-204.
6. Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HA, et al. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *JAMA* 1997;278:1237-41.
7. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, et al. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 1998;19:357-60.
8. Müller HW, Gebicke-Harter PJ, Hangen DH, Shooter EM. A specific 37,000-dalton protein that accumulates in regenerating but not in non-regenerating mammalian nerves. *Science* 1985;228:499-501.
9. Ignatius MJ, Gebicke-Harter PJ, Skene JH, Schilling JW, Weisgraber KH, Mahley RW, Shooter EM. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83: 1125-9.
10. Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA. Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1130-4.
11. Chen Y, Lomnitski L, Michaelson DM, Shohami E. Motor and cognitive deficits in apolipoprotein E-deficient mice after closed head injury. *Neuroscience* 1997;80:1255-62.
12. Masliah E, Samuel W, Veinbergs I, Mallory M, Mante M, Saitoh T. Neurodegeneration and cognitive impairment in apoE-deficient mice is ameliorated by infusion of recombinant apoE. *Brain Res* 1997;751:307-14.
13. Raber J, Wong D, Buttini M, Orth M, Bellota S, Pitas RE, et al. Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10914-9.
14. Sheng H, Laskowitz DT, Bennett E, Schmechel DE, Bart RD, Saunders AM, et al. Apolipoprotein E isoform-specific differences in outcome from focal ischemia in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18: 361-6.
15. Buttini M, Orth M, Bellota S, Akeefe H, Pitas RE, Wyss-Coray T, et al. Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of APOE -/- mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci* 1999;19:4867-80.
16. Nicoll JA, Burnett C, Love S, Graham DI, Ironside JW, Vinters HV. High frequency of apolipoprotein E epsilon 2 in patients with cerebral hemorrhage due to cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neural* 1996;39: 682-3.
17. Teasdale GM, Nicoll JA, Murray G, Fiddes M. Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury. *Lancet* 1997; 350:1069-71.
18. Slooter AJ, Tang MX, van Duijn CM, Stern Y, Ott A, Bell K, et al. Apolipoprotein E epsilon4 and the risk of dementia with stroke. A population-based investigation. *JAMA* 1997;277:818-21.
19. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, et al. Linkage studies in familial Alzheimer's disease. Evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 1991;48:1034-50.

20. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance MA, Eng-hild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: High-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1977-81.
21. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;8:1-21.
22. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, St George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al. Association of apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 1993;43:1467-72.
23. Schachter F, Faure-Delanef L, Guenot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, et al. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet* 1994;6:29-32.
24. Corder E, Saunders A, Risch N, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 1994;7:180-4.
25. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type $\epsilon 4$ allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993;261:921-3.
26. Yoshizawa T, Yamakawa-Kobayashi K, Komatsuzaki Y, Arinami T, Oguni E, Mizusawa H, et al. Dose-dependent association of apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ with late-onset, sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994;36:656-9.
27. Tang MX, Stern Y, Marder K, Bell K, Gurland B, Lantigua R, et al. The APOE- ϵ 4 allele and the risk of Alzheimer's disease among African Americans, whites, and Hispanics. *JAMA* 1998;279:751-5.
28. Bickeboller H, Campion D, Brice A, Amouyel P, Hannequin D, Didierjean O, et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *Am J Hum Genet* 1997;60:439-46.
29. Payami H, Zareparsi S, Montee KR, Sexton GJ, Kaye JA, Bierd TD, et al. Gender difference in apolipoprotein E-associated risk for Alzheimer disease: a possible due to the higher incidence of Alzheimer disease in women. *Am J Hum Genet* 1996;58:803-11.
30. Adroer R, Santacruz P, Blesa R, López-Pousa S, Ascaso C, Oliva R. Apolipoprotein E4 allele frequency in Spanish Alzheimer and control cases. *Neurosci Lett* 1995;189:182-6.
31. Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, García MA, Alduno J, et al. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett* 1998;421:105-8.
32. Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, García MA, Alduno J, et al. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet* 1998;18:69-71.
33. Mui S, Briggs M, Chung H, Wallace RB, Gomez Isla T, Rebeck GW, et al. A newly identified polymorphism in the apolipoprotein E enhancer gene region is associated with Alzheimer's disease and strongly with the epsilon 4 allele. *Neurology* 1996;47:196-201.
34. Artiga MJ, Bullido MJ, Frank A, Sastre I, Recuero M, García MA, et al. Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Genet* 1998;7:1887-92.
35. Lambert JC, Pasquier F, Cottel D, Frigard B, Amouyel P, Chartier-Harlin MC. A new polymorphism in the APOE promoter associated with risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1998;7:533-40.
36. Lambert JC, Berr C, Pasquier F, Delacourte A, Frigard B, Cottel D, et al. Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1998;7:1511-6.
37. Laws SM, Taddei K, Martins G, Paton A, Fisher C, Clarnette R, et al. The -491 AA polymorphism of the apolipoprotein E gene is associated with increased plasma ApoE levels in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1999;10:879-82.
38. Bullido MJ, Valdivieso F. Apolipoprotein E gene promoter polymorphisms in Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 2000;50:261-7.
39. Roks G, Cruts M, Bullido MJ, Backhovens H, Artiga MJ, Hofman A, et al. The -491 polymorphism in the regulatory region of the apolipoprotein E gene and early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1998;258:65-8.
40. Ahmed AR, MacGowan SH, Culpan D, Jones RW, Wilcock GK. The -491 A/T polymorphism of the apolipoprotein E gene is associated with the APOE e4 allele and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;263:217-9.
41. Casadei VM, Ferri C, Veglia F, Gavazzi A, Salani G, Cattaneo M, et al. APOE-491 promoter polymorphism is a risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 1999;53:1888-9.
42. Song YQ, Rogaeva E, Premkumar S, Brindle N, Kawarai T, Orlacchio A, et al. Absence of association between Alzheimer's disease and the -491 regulatory region polymorphism of APOE. *Neurosci Lett* 1998;250:189-92.
43. Town T, Paris D, Fallin D, Duara R, Barker W, Gold M, et al. The -491 A/T apolipoprotein E promoter polymorphism association with Alzheimer's disease: Independent risk and linkage disequilibrium with the known APOE polymorphism. *Neurosci Lett* 1998;252:95-8.
44. Helisalmi S, Hiltunen M, Valonen P, Mannermaa A, Koivisto AM, Lehtovirta M, et al. Promoter polymorphism (-491A/T) in the APOE gene of Finnish Alzheimer's disease patients and control individuals. *J Neurol* 1999;246:821-4.
45. Toji H, Maruyama H, Sasaki K, Nakamura S, Kawakami H. Apolipoprotein E promoter polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neurosci Lett* 1999;259:56-8.
46. Chen L, Baum L, Ng HK, Chan LY, Sastre I, Artiga MJ, et al. Apolipoprotein E promoter and alpha2-macroglobulin polymorphisms are not genetically associated with Chinese late onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;269:173-7.
47. Thome J, Gewirtz JC, Sakai N, Zachariou V, Retz-Junginger P, Retz W, et al. Polymorphisms of the human apolipoprotein E promoter and bleomycin hydrolase gene: risk factors for Alzheimer's dementia? *Neurosci Lett* 1999;274:37-40.
48. Zurutuza L, Verpillat P, Raux G, Hannequin D, Puel M, Belliard S, et al. APOE promoter polymorphisms do not confer independent risk for Alzheimer's disease in a French population. *Eur J Hum Genet* 2000;8:713-6.
49. Rebeck GW, Cheung BS, Growdon WB, Deng A, Akuthota P, Locascio J, et al. Lack of independent associations of apolipoprotein E promoter and intron 1 polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999;272:155-8.
50. Fukushima Y, Bell GI, Shows TB. The polymorphic human alpha-2-macroglobulin gene (A2M) is located in chromosome region 12p12.3-p13.3. *Cytogenet Cell Genet* 1988;48:58-9.
51. Marynen P, Zhang J, Devriendt K, Cassiman JJ. Alpha-2-macroglobulin, pregnancy zone protein and an alpha-2-macroglobulin pseudogene map to chromosome 12p12.2-p13. (Abstract) *Cytogenet Cell Genet* 1989;51:1040.
52. Devriendt K, Zhang J, van Leuven F, van den Berghe H, Cassiman JJ, Marynen P. A cluster of alpha 2-macroglobulin-related genes (alpha 2 M) on human chromosome 12p: cloning of the pregnancy-zone protein gene and an alpha 2M pseudogene. *Gene* 1989;81:325-34.
53. Matthijs G, Devriendt K, Cassiman JJ, van den Berghe H, Marynen P. Structure of the human alpha-2 macroglobulin gene and its promotor (sic). *Biochem Biophys Res Commun* 1992;184:596-603.
54. Álvarez V, Álvarez R, Lahoz CH, Martínez C, Pena J, Guisáosla LM, et al. Association between an $\alpha 2$ macroglobulin DNA polymorphism and late-onset Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:48-50.
55. Dow DJ, Lindsey N, Cairns NJ, Brayne C, Robinson D, Huppert FA, et al. Alpha-2 macroglobulin polymorphism and Alzheimer disease risk in the UK (Letter). *Nature Genet* 1999;22:16-7.
56. Rudrasingham V, Wavrant-De Vrieze F, Lambert JC, Chakraverty S, Kehoe P, Crook R, et al. Alpha-2 macroglobulin gene and Alzheimer disease (Letter). *Nature Genet* 1999;22:17-9.

57. Rogeava EA, Premkumar S, Grubber J, Serneels L, Scott WK, Kawarai T, et al. An alpha-2-macroglobulin insertion-deletion polymorphism in Alzheimer disease. (Letter) *Nature Genet* 1999;22:19-21.
58. Asociación Americana de Psiquiatría. DSM-IV. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Masson SA. Barcelona, 1995. (Traducción al castellano de: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth edition. DSM-IV™. American Psychiatry Association, Washington DC, 1994).
59. 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.
60. Lobo A, Ezquerre J, Gómez FB, Sala JM, Seva A. El Mini Examen Cognoscitivo. Un test sencillo y práctico para detectar alteraciones conductuales en pacientes médicos. *Actas Luso-Esp Neurol Psiquiatr* 1979;7:189-92.
61. Folstein MF, Folstein SE, Mc Hugh PR. Mini-mental State. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189-98.
62. Roth M, Tym E, Mountjoy CQ. CAMDEX: A standardised instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br J Psychiatry* 1986;149:698-709.
63. Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MA. The index of ADL: A standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA* 1963;185:914-9.
64. Sclar SG, Reisberg B. Functional assessment staging (FAST) in Alzheimer's disease: reliability, validity, and ordinality. *Int Psychogeriatr* 1992; 4:55-69.
65. Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J. The Neuropsychiatric Inventory: comprehensible assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* 1994;44:2308-14.
66. Kurz A, Haupt M, Pollmann S, Romero B. Enfermedad de Alzheimer: ¿Hay datos de la existencia de subtipos fenomenológicos? Observaciones de un estudio longitudinal. *Dementia* 1993;3:144-51.
67. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hhal. *J. lipid Res* 1990;31: 545-8.
68. Bullido MJ, Guallar-Castillon P, Artiga MJ, Ramos MC, Sastre I, Alduno J, et al. Alzheimer's risk associated with human apolipoprotein E, alpha-2 macroglobulin and lipoprotein receptor related protein polymorphisms: absence of genetic interactions, and modulation by gender. *Neurosci Lett* 2000;289:213-6.

NOTA DE LA REDACCIÓN

El Director de la Biblioteca Nacional de Ciencias de la Salud nos comunica en enero de 2002 que la Revista Española de Geriatría y Gerontología ha sido incluida en el Índice Bibliográfico Español en Ciencias de la Salud (IBECS).