

Estudio molecular de los polimorfismos comunes del gen *apoE* asociados con disbetalipoproteïnemia familiar y la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

Informes de Evaluación de Tecnologías
Sanitarias

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN



Estudio molecular de los polimorfismos comunes del gen *apoE* asociados con disbetalipoproteïnemia familiar y la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

Informes de Evaluación de Tecnologías
Sanitarias

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN



Estudio molecular de los polimorfismos comunes del gen apoE asociados con disbetalipoproteinemia familiar y la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. / Elena de Tomás Mateo, María Eugenia Marta Moreno, Silvia Izquierdo Alvarez, Juan Ignacio Martín Sánchez - Madrid: Ministerio de Sanidad. Zaragoza: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) - 129 p.; 24 cm (Colección: Informes, estudios e investigación. Serie: Informes de evaluación de tecnologías sanitarias. IACS)

NIPO: 133-23-121-6

ISBN: 978-84-09-56450-7

DOI: https://doi.org/10.46994/ets_36

1. Disbetalipoproteinemia familiar. 2. Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. 3. Modelos de predicción.

I. Aragón. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS). II. España. Ministerio de Sanidad.

Edición: 2023

Edita: Ministerio de Sanidad

Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS)

NIPO: 133-23-121-6

ISBN: 978-84-09-56450-7

DOI: https://doi.org/10.46994/ets_36

Maquetación: Gambón, S. A.

Este documento ha sido realizado por el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud en el marco de la financiación del Ministerio de Sanidad para el desarrollo de las actividades del Plan anual de Trabajo de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del Sistema Nacional de Salud (SNS), aprobado en el Pleno del Consejo Interterritorial del SNS el 15 de junio de 2022.

Este documento puede ser reproducido total o parcialmente, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia.

Para citar este informe:

de Tomás Mateo E, Marta Moreno M.E, Izquierdo Álvarez S, Martín Sánchez J.I. Estudio molecular de los polimorfismos comunes del gen *apoE* asociados con disbetalipoproteinemia familiar y la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Ministerio de Sanidad. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud; 2023. Informe de Evaluación de Tecnologías Sanitarias: IACS

Índice

| | |
|---|----|
| Índice de tablas | 9 |
| Índice de figuras | 11 |
| Autoría y colaboraciones | 13 |
| Resumen | 15 |
| Summary | 19 |
| Abreviaturas | 23 |
| Glosario | 27 |
| Introducción | 33 |
| 1. Principales funciones del gen <i>apoE</i> | 34 |
| 1.1. <i>ApoE</i> y metabolismo lipídico | 35 |
| 1.2. <i>ApoE</i> y cerebro | 37 |
| 2. Enfermedades primarias asociadas al gen <i>apoE</i> | 37 |
| 2.1. Enfermedad cardiovascular y aterosclerótica | 37 |
| 2.2. Disbetalipoproteinemia familiar | 37 |
| 2.2.1. Epidemiología | 38 |
| 2.2.2. Diagnóstico | 38 |
| 2.2.3. Tratamiento | 42 |
| 2.3. Enfermedad de Alzheimer | 42 |
| 2.3.1. Epidemiología | 44 |
| 2.3.2. Diagnóstico | 44 |
| 2.3.3. Tratamiento | 47 |
| 2.3.4. Impacto de la EA | 49 |
| 2.4. Consideraciones generales | 50 |
| 3. Determinación molecular de los polimorfismos del gen <i>apoE</i> | 51 |
| 3.1. Genotipado por PCR a tiempo real | 53 |
| Alcances y Objetivos | 59 |
| Metodología | 61 |
| 1. Pregunta de investigación | 61 |

| | | |
|--|--|-----|
| 2. | Búsqueda bibliográfica | 63 |
| 3. | Criterios de selección de estudios | 63 |
| 4. | Extracción de datos | 65 |
| 5. | Evaluación de la calidad de los estudios | 66 |
| Resultados | | 67 |
| 1. | Papel del genotipado de <i>apoE</i> por qPCR en el diagnóstico de la DBLP | 67 |
| 2. | Identificación y comparación de estudios predictivos pronósticos para la estimación del riesgo de padecer EA de inicio tardío que integren el genotipado de <i>apoE</i> por qPCR | 73 |
| 3. | Aspectos éticos y legales | 75 |
| 3.1. | Genotipado de <i>apoE</i> por qPCR en el diagnóstico de la DBLP | 75 |
| 3.2. | Incorporación del genotipado de <i>apoE</i> por qPCR a modelos pronóstico para la EA de inicio tardío | 76 |
| Discusión | | 79 |
| Conclusiones | | 87 |
| Futuras líneas de investigación | | 89 |
| Bibliografía | | 91 |
| Anexos | | 111 |
| | Anexo 1: Clasificación de las dislipemias según fenotipo lipídico (Clasificación de Fredrickson) | 111 |
| | Anexo 2: Clasificación de las dislipemias primarias según etiología | 112 |
| | Anexo 3: Estrategia de búsqueda bibliográfica | 113 |
| | Anexo 4: Diagrama de flujo. Genotipado de <i>apoE</i> por qPCR en el diagnóstico de la DBLP | 120 |
| | Anexo 5: Diagrama de flujo. Genotipado de <i>apoE</i> por qPCR en modelos predictivos pronóstico de EA de inicio tardío | 121 |
| | Anexo 6: Estudios excluidos y motivo de exclusión: DBLP | 122 |
| | Anexo 7: Estudios excluidos y motivo de exclusión: EA de inicio tardío | 124 |
| | Anexo 8: Síntesis de la evidencia: Papel del genotipado de <i>apoE</i> en el diagnóstico de la DBLP | 127 |
| | Anexo 9: Modelos predictivos pronóstico para establecer riesgo de aparición de EA de inicio tardío que incluyen genotipado <i>apoE</i> | 128 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Genotipos resultantes del gen <i>apoE</i> | 33 |
| Tabla 2. Comparación del rendimiento diagnóstico de otros algoritmos con el modelo propuesto para la DBLP en pacientes hiperlipidémicos | 70 |
| Tabla 3. Evaluación comparativa de los diferentes algoritmos diagnóstico de DBLP en personas hiperlipidémicas según criterios de Bea et al. | 72 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Transporte lipídico de apoE a lo largo de los diferentes tejidos | 36 |
| Figura 2. Ejemplo de algoritmo diagnóstico para la DBLP | 41 |
| Figura 3. Flujo de trabajo básico para la determinación por qPCR en un laboratorio de biología molecular | 54 |
| Figura 4. Ejemplo de diagrama esquemático de método de genotipado de <i>apoE</i> por qPCR alelo-específica usando una sonda tipo TaqMan® | 55 |
| Figura 5. Ejemplo de representación de las curvas de amplificación para un ensayo alelo-específico de <i>apoE</i> | 56 |
| Figura 6. Análisis por HRM de los SNP rs429358 y rs7412 | 57 |

Autoría y colaboraciones

Autoría

Elena de Tomás Mateo. Bióloga. Especialista en Biología Molecular. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza.

Maria Eugenia Marta Moreno. Médico Especialista en Neurología. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza.

Silvia Izquierdo Álvarez. Química. Especialista en Bioquímica Clínica. Sección de Genética Clínica. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza.

Juan Ignacio Martín Sánchez. Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza.

Documentalista

María Pilar Blas Díez. Documentalista. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza.

Apoyo Administrativo

María Esther García Pomar. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Zaragoza

Sofía Julián Ullate. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Zaragoza.

Revisión externa

Ricardo González Tarancón. Biólogo. Especialista en Bioquímica Clínica. Sección de Genética Clínica. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza.

Agradecimientos

Por su participación en el desarrollo del protocolo de investigación de este informe, nuestro agradecimiento a:

Silvia Vázquez Fernández del Pozo. Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza.

Declaración de Intereses

Todos los profesionales que han participado en este informe de evaluación han completado el formulario de declaración de intereses. Tras la aplicación del procedimiento de gestión de los conflictos de interés de la Red Española de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del SNS se declara que: ningún profesional fue excluido del proceso en base a la información declarada. Los revisores externos del documento no suscriben necesariamente todas y cada una de las conclusiones, que son responsabilidad exclusiva de los autores.

Resumen

Título: Estudio molecular de los polimorfismos comunes del gen *apoE* asociados con disbetalipoproteinemia familiar y la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

Introducción

La apolipoproteína ApoE es una proteína reguladora del transporte de colesterol y del metabolismo a nivel periférico y del sistema nervioso central (SNC). Debido a su efecto pleitrópico, sus diferentes variaciones pueden generar un gran impacto en el diagnóstico y pronóstico de multitud de enfermedades prevalentes; entre las que se incluyen diferentes condiciones de tipo cardiovascular o neurodegenerativas. Concretamente, el alelo $\epsilon 4$ está relacionado con mayor riesgo de desórdenes cerebrovasculares y el desarrollo de enfermedad de Alzheimer (EA) de inicio tardío; mientras que el alelo $\epsilon 2$ es considerado el de riesgo para el desarrollo de las dislipemias como la disbetalipoproteinemia familiar (DBLP). La determinación del genotipo de *apoE* por la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) se presenta como una alternativa a otros métodos de genotipado ampliamente usados y que cuentan con una serie de limitaciones para su implementación en la práctica clínica.

Los objetivos de este informe fueron la evaluación de la determinación de *apoE* por qPCR en el diagnóstico de la DBLP; y su integración como factor predictor, dentro de un modelo pronóstico con el objetivo de establecer el riesgo de EA de inicio tardío. Este informe pretende evaluar la capacidad del uso de esta tecnología en el contexto descrito, y su comparativa respecto a otras técnicas genéticas (y/o fenotípicas, en el caso de DBLP).

Metodología

Revisión sistemática de la evidencia científica que evalúa el uso de qPCR para el genotipado de *apoE* en el contexto del objetivo del estudio. Se consultaron las siguientes bases de datos: Medline, Embase, The Cochrane Library, Web of Science, International HTA Database. Además, se realizó una búsqueda de ensayos clínicos en curso: ClinicalTrial.gov, Current Con-

trolled Trial (ISRCTN registry), International Clinical Trials Registry Platform (WHO) y EU Clinical Trials Register.

Resultados

DBLP:

Se recuperaron un total de 284 referencias bibliográficas, de las cuales, únicamente un estudio cumplió con los criterios de inclusión¹. La mayoría de los trabajos fueron descartados por emplear otro tipo de técnicas para el genotipado de *apoE*, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCR-RLFP) o por secuenciación. En el único estudio incluido donde emplean esta técnica, su objetivo se centra en la puesta a punto de un algoritmo diagnóstico para el cribado de la DBLP¹. Los autores incluyen una nueva definición de hiperlipidemia, junto con la descripción de unos valores umbrales a partir del perfil lipídico del paciente. Además de poner a punto el criterio diagnóstico, éste también es evaluado respecto a otros algoritmos disponibles en la literatura; obteniéndose unos valores de sensibilidad, exactitud diagnóstica y/o especificidades más altos que con los otros criterios comparados²⁻⁵. Sin embargo, este estudio cuenta con algunas limitaciones como es la heterogeneidad de la población de estudio o la ausencia de grupos comparadores de la tecnología de caracterización de *apoE* respecto a otras técnicas¹.

EA de inicio tardío:

Se identificaron un total de 818 estudios de los cuales ninguno de ellos cumplió con la premisa del uso de la qPCR para *apoE* integrado en un modelo predictivo pronóstico de EA de inicio tardío. La mayoría de las publicaciones que se identificaron hacían uso de la qPCR para el genotipado de *apoE* para su inclusión en modelos de tipo diagnóstico. Atendiendo a uno de los objetivos del informe, en el proceso de búsqueda bibliográfica se recopilaron un total de 8 estudios que recogían modelos de tipo pronóstico en los que se empleaban otras técnicas genéticas diferentes a la qPCR⁶⁻¹². En la mayoría de los estudios los pacientes procedían de bases de datos donde la técnica empleada para el análisis de *apoE* era la PCR-RFLP^{7,9,11-13}. Entre los factores predictores más representados junto con *apoE*, son la edad, sexo, función cognitiva o diversos parámetros de imagen como el análisis de regresión tipo Cox de las regiones de interés (COX-ROI), análisis de covarianza de regiones de interés (ANCOVA-ROI) o imagen por resonancia

magnética (IRM) y biomarcadores en sangre como beta amiloide $A\beta_{1-42}$ ó la proteína tau fosforilada (p-tau).

Discusión

En referencia a la evaluación de esta tecnología como método de determinación del genotipado de *apoE* en el diagnóstico de la DBLP, su uso reside en una prueba de tipo de confirmatorio que normalmente acompaña a otras determinaciones del perfil lipídico. Además de la ausencia de trabajos en los que sea la qPCR el procedimiento de elección, en el único estudio identificado no se contempla un ensayo comparativo con otras técnicas genéticas o fenotípicas para la caracterización de *apoE*. Por otro lado, hay que tener en consideración que un 10% de las DBLP se presentan con un patrón de herencia de tipo autosómico dominante; y por tanto diferente al típico patrón de alelos $\epsilon 2/\epsilon 2$, por lo que el empleo de la técnica de qPCR podría contribuir a infradiagnosticar esta condición.

En referencia al empleo del genotipado de *apoE* por qPCR integrado en un modelo predictivo pronóstico de EA de inicio tardío no se encontraron estudios que apoyen su uso. Los modelos identificados con este propósito y que además incluyen el genotipado de *apoE*, aún sin ser la qPCR la técnica de elección, se tratan de modelos que ofrecen insuficiente información para ser usados en la práctica clínica habitual y que permitan establecer el riesgo a nivel individual de desarrollar EA de inicio tardío.

Por otro lado, conviene tener en cuenta que tanto la DBLP como la EA se trata de patologías de carácter multifactorial donde, es necesario la confluencia de varios factores, más allá de ser portador de un determinado patrón genético, para que se desarrolle la enfermedad. En el caso de la DBLP, contar con este tipo de información podría considerarse una ventaja, debido fundamentalmente a la existencia de un tratamiento farmacológico eficaz y/u otras medidas preventivas potencialmente instaurables. Por el contrario, en relación a la EA de inicio tardío, conviene tener en cuenta las consideraciones éticas y legales que acarrear la disponibilidad de esta información ligada únicamente al concepto de “genes de susceptibilidad” o “riesgo aumentado”; debido al gran impacto a nivel social, emocional y económico tanto para el paciente como para su entorno, además de no contar con una aproximación terapéutica que ofrecer al paciente para impedir su desarrollo.

Conclusiones

El gen *apoE* tiene un papel biológico relevante en el metabolismo humano de los lípidos, lo que ha llevado al desarrollo de distintas técnicas que permiten analizar los polimorfismos del mismo y las isoformas que se generan.

No hay suficiente evidencia científica que apoye la inclusión de la técnica de qPCR como método de genotipado de *apoE* en la práctica clínica diaria ni que implique un valor añadido dentro de un algoritmo diagnóstico de la DBLP, ni como determinación a integrar en un modelo pronóstico de detección temprana de EA de inicio tardío, respecto a otras técnicas de genotipado disponibles actualmente.

En un entorno de medicina de precisión e independientemente de la técnica de genotipado empleada para la caracterización del gen *apoE*, disponer de esta información puede ser relevante para, de una manera individualizada, en personas con manifestaciones y/o alteraciones bioquímicas lipídicas, la adopción temprana de medidas terapéuticas en el caso de la DBLP homocigotas y; en personas con sospecha de EA de inicio tardío (60 años o más de edad), la puesta en marcha de medidas que permitan modificar los factores de riesgo que puedan estar bajo el control de la persona y familiares, teniendo presentes los recursos disponibles en su entorno para informar adecuadamente a la persona y acceder a los mismos en caso de necesidad.

Summary

Title: Molecular study of common *apoE* gene polymorphisms associated with familial dysbetalipoproteinaemia and late-onset Alzheimer's disease.

Introduction

Apolipoprotein ApoE is a protein that regulates cholesterol transport and metabolism in the peripheral and central nervous systems. Due to its pleiotropic effect, its different variations can have a major impact on the diagnosis and prognosis of a variety of prevalent diseases, including several cardiovascular and neurodegenerative conditions. Specifically, the $\epsilon 4$ allele is associated with an increased risk of cerebrovascular disorders and the development of late-onset Alzheimer's disease, whereas the $\epsilon 2$ allele is considered the risk one for the development of dyslipidaemias such as familial dysbetalipoproteinemia. *ApoE* genotyping by real-time polymerase chain reaction (qPCR) technology is presented as an alternative to other widely used genotyping methods, which have a large number of limitations for the implementation in clinical practice.

The objectives of this report were to evaluate *apoE* determination by qPCR in the diagnosis of familial dysbetalipoproteinemia; and its integration as a predictive factor within a prognostic model with the aim of establishing the risk of late-onset Alzheimer's disease. This report aims to evaluate the use of this technology in the described context, and its comparison with other genetic (and/or phenotypic, in the case of familial dysbetalipoproteinemia) techniques.

Methodology

Systematic review of the scientific evidence evaluating the use of qPCR for *apoE* genotyping in the described context. The following databases were consulted: Medline, Embase, The Cochrane Library, Web of Science, International HTA Database and TESEO. In addition, a search for ongoing clinical trials were also conducted: ClinicalTrial.gov, Current Controlled Trial (ISRCTN registry), International Clinical Trials Registry Platform (WHO) and EU Clinical Trials Register.

Results

Familial dysbetalipoproteinemia:

A total of 284 bibliographic references were identified of which only one study met the inclusion criteria¹. Most of the studies were excluded because they used other techniques for *apoE* genotyping, mainly polymerase chain reaction with restriction fragment polymorphism analysis (PCR-RLFP) or sequencing.

The only included study that used this *apoE* genotyping techniques is focused on developing a diagnostic algorithm for familial dysbetalipoproteinemia screening¹. The authors introduce a new definition of hyperlipidaemia, and a description of threshold values based on patient's lipid profile. In addition to develop a diagnostic criterion, it is also evaluated against other algorithms available in the literature, yielding higher values for sensitivity, diagnostic accuracy and/or specificity than other criteria compared²⁻⁵. However, this study has some limitations such as the heterogeneity of the population or the absence of comparator groups of the *apoE* characterisation technology with respect to other techniques¹.

Alzheimer's disease:

A total of 818 studies were identified, none of which fulfilled the premise of using qPCR for *apoE* integrated into a predictive prognostic model for late-onset Alzheimer's disease. Most of the publications identified used qPCR for *apoE* genotyping for inclusion in diagnostic models. According to one of the objectives of the report, a total of 8 studies were collected in the literature search process that included prognostic models using genetic technique other than qPCR⁶⁻¹². In the majority of the studies the patients came from databases where the technique used for *apoE* analysis was PCR-RFLP^{7,9,11-13}. The most commonly used predictors in addition to *apoE* are age, gender, cognitive function or various imaging parameters such as Cox regression analysis of regions of interest (COX-ROI), analysis of covariance of regions of interest (ANCOVA-ROI) or magnetic resonance imaging and blood biomarkers such as beta-amyloid A β 1-42 or phosphorylated tau protein (p-tau).

Discussion

In reference to the evaluation of this technology as a method for *apoE* genotyping in the diagnosis of familial dysbetalipoproteinemia, it resides as a confirmatory test that is usually performed in conjunction with other lipid profile determinations. In addition to the lack of studies in which qPCR is the method of choice, the only identified study does not include a comparative assay with other genetic or phenotypic techniques for *apoE* characterisation. In addition to, it should be considered that 10% of familial dysbetalipoproteinemia present an autosomal dominant inheritance pattern, and therefore differ from the typical $\epsilon 2/\epsilon 2$ allele pattern, so the use of qPCR may contribute to under-diagnosis this condition.

Regarding the use of *apoE* genotyping by qPCR integrated into a predictive prognostic model for late-onset Alzheimer's disease, no studies were found to support its use. The models identified for this purpose that also include *apoE* genotyping, although qPCR is not the technique of choice, are models that provide insufficient information to be used in routine clinical practice and to determine the risk of developing late-onset Alzheimer's disease at an individual level.

On the one hand, it should be taken into account that both familial dysbetalipoproteinemia and Alzheimer's disease are multifactorial diseases in which the combination of several factors, in addition to carrying a particular genetic pattern, is necessary for the development of the disease. In case of familial dysbetalipoproteinemia, having this type of information could be considered an advantage, mainly because of the existence of an effective pharmacological treatment and/or other preventive measures that could potentially be put in place. On the other hand, in case of late-onset Alzheimer's disease, it is important to keep in mind the ethical and legal considerations associated with the availability of this information linked only to the concept of "susceptibility genes" or "increased risk", given the great social, emotional and economic impact on both the patient and his or her environment, as well as the lack of a therapeutic approach to offer the patient to prevent its development.

Conclusions

The *apoE* gene plays an important biological role in human lipid metabolism, which has led to the development of different techniques to analyse its polymorphisms and the isoforms generated.

There is insufficient scientific evidence to support the use of the qPCR technique as an *apoE* genotyping method in daily clinical practice or as an added value within a diagnostic algorithm for familial dysbetalipoproteinemia, or as a determination to be incorporated into a prognostic model for early detection of late-onset Alzheimer's disease, compared to other genotyping techniques currently available.

In the context an environment of precision medicine, and independently of the genotyping technique used to characterize the *apoE* gene; the availability of having this information may be relevant for to, in an individualized manner, people with manifestations and/or biochemical lipid alterations, can early adoption therapeutic measures in the case of homozygous familial dysbetalipoproteinemia. For people suspected of having late-onset Alzheimer's disease (60 years of age or older), the implementation of measures to modify the risk factors that may be under the control of the person and their family members, taking into account the resources available in their environment in order to adequately inform the person and access them, if necessary.

Abreviaturas

¹¹C-PiB: Componente B de Pittsburgh.

A β : Beta amiloide.

ADAS-Cog: *Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale.*

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNI: *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.*

AINEs: Antiinflamatorios no esteroides.

ANCOVA-ROI: Análisis de covarianza de regiones de interés.

apoA: Apolipoproteína A.

apoB: Apolipoproteína B.

apoCII: Apolipoproteína CII.

apoE: Apolipoproteína E.

apoE: Gen codificador de la apolipoproteína E.

Arg: Arginina.

ARMS: Sistema de mutación refractario de amplificación (*amplification refractory mutation system*).

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ASO: Oligonucleótidos específicos de alelo (*allele-specific oligonucleotide probes*).

AWHS: Estudio de trabajadores de Aragón (*Aragon Workers' Health Study*).

AV45: Florbetapir (¹⁸F).

BHQ: Molécula apantalladora tipo “*Black Hole Quencher*”.

C: Citosina.

CEAFA: Confederación Española de Alzheimer.

CCAA: Comunidad autónoma.

CDR-SB: Suma de casillas de la Escala de valoración clínica de la demencia (*Clinical Dementia Rating scale-Sum of Boxes*).

Cys: Cisteína.

cLDL: Colesterol de lipoproteínas de baja densidad (*Low density lipoprotein*).

CM: Quilomicrones.

COX-ROI: Análisis de regresión tipo Cox de las regiones de interés.

CPN: Cociente de probabilidad negativo.

CPP: Cociente de probabilidad positivo.

CT: Colesterol total.

DBLP: Disbetalipoproteinemia familiar o hiperlipoproteinemia tipo III.

DCL: Deterioro cognitivo leve.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

Dominio N: Dominio N-terminal.

Dominio C: Dominio carboxilo-terminal.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

ECV: Enfermedad cardiovascular.

EIE: Enfoque isoelectrico (*isoelectric focusing*)

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*.

EMCI: Deficiencia cognitiva leve (*early mild cognitive impairment*).

EtBr: Bromuro de etidio.

FDA: *Food & Drug Administration*.

FDG: Fluorodexiglucosa.

FFA”: Ácidos grasos libres (*free fatty acids*).

FRET: Transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (*Fluorescent Resonance Energy Transfer*)

FN: Falsos negativos.

FP: Falsos positivos.

GPCOG: *General Practitioner Assessment of Cognition*.

GRADE: *Grading of Recommendations, Assessment and Evaluation*.

- GWAS:** Estudios de asociación de genoma completo (*Genome-wide association studies*).
- HDL:** Lipoproteínas de alta densidad (*High density lipoprotein*).
- HP:** Hiperlipidémicos.
- HR:** Cociente de riesgos (*Hazard ratio*).
- HRM:** Análisis de alta resolución de fusión (*High resolution melting*).
- HUMS:** Hospital Universitario Miguel Servet.
- IMC:** Índice de masa corporal.
- IRM:** Imagen por resonancia magnética.
- kDa:** Kilodalton.
- LCR:** Líquido cefalorraquídeo.
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad (*Low density lipoprotein*).
- LDLR:** Receptores de lipoproteínas de baja densidad (*Low density lipoprotein receptors*).
- LMCI:** Deficiencia cognitiva avanzada (*late mild cognitive impairment*).
- LPS:** Lipopolisacáridos.
- miR-eQTLs:** Polimorfismos de un sólo nucleótido de pares de micro RNA (*Single nucleotide polymorphism-microRNA pairs*).
- MIS:** *Memory Impairment Screen*.
- MMSE:** Test Mini-Mental (*Mini-Mental State Examination*).
- NACC:** *National Alzheimer's Coordinating Center*.
- noHDLc:** Colesterol no HDL (*non-high density lipoprotein cholesterol*).
- NMDAr:** Receptor de N-metil-D-aspartato.
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).
- PCR-RFLP:** Reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*).
- PET:** Tomografía por emisión de positrones (*Positron Emission Tomography*).

- PRP:** Puntuación de riesgo poligénico.
- p-tau:** Proteína tau fosforilada.
- qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*Real-Time Polymerase chain reaction or quantitative polymerase chain reaction*).
- SNC:** Sistema nervioso central.
- SNP:** Polimorfismo de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polimorphism*).
- SNS:** Sistema Nacional de Salud.
- SPARE-AD index:** índice espacial de patrón de anomalías para el reconocimiento de la EA.
- SSCP:** Polimorfismo de conformación de cadena sencilla (*Single strand conformation polymorphism*).
- T:** Timina.
- TG:** Triglicéridos.
- Tm:** Temperatura de fusión (*melting temperature*).
- t-tau:** Proteína total Tau.
- UHG:** Generador heteroduplex universal (*Universal heteroduplex generator*).
- VHC:** Volumen hipocampal.
- VHS:** Virus herpes simple.
- VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana.
- VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad (*Very low density lipoprotein*).
- VN:** Verdaderos negativos.
- VNC:** Variaciones en el número de copias (*copy number variation*).
- VP:** Verdaderos positivos.
- VPN:** Valor predictivo negativo.
- VPP:** Valor predictivo positivo.
- VTI:** Volumen total intracraneal.

Glosario

Alelo: Una de las dos formas de un gen que expresa un carácter determinado en un par de cromosomas homólogos localizados en el mismo locus (posición). Procedentes uno del padre y el otro de la madre, pueden ser idénticos o diferentes.

Cebador: Secuencia corta de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación de ADN. Contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases complementarias a una hebra molde y que actúa de punto de partida para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Codón: Secuencia de ADN o ARN de tres nucleótidos que forma una unidad de información genómica que codifica un aminoácido particular o señala la terminación de la síntesis de proteínas (señales de parada). Hay 64 codones diferentes: 61 especifican aminoácidos y 3 se utilizan como señales de parada. Los ribosomas insertan el aminoácido correcto que corresponde a cada código del triplete que está en el codón.

Componente B de Pittsburgh B (PiB): Análogo radiactivo de la tioflavina T, que se puede utilizar en tomografías por emisión de positrones (PET) para obtener imágenes de placas de beta amiloide (A β) en el tejido neuronal.

Diploide: Presencia de dos juegos completos de cromosomas en las células de un organismo, y cada progenitor contribuye con un cromosoma a cada par. Los seres humanos son diploides y la mayoría de las células del cuerpo contienen 23 pares de cromosomas. Los gametos humanos (óvulos y espermatozoides), sin embargo, contienen un solo conjunto de cromosomas y se dice que son haploides.

Enfoque isoeléctrico (EIE): Técnica de separación de moléculas de acuerdo a su diferente punto isoeléctrico (pH en el que una molécula no tiene carga eléctrica neta o es eléctricamente neutra). Es un tipo de electroforesis de zona que generalmente se realiza en proteínas en un gel que aprovecha el hecho de que la carga general de la molécula de interés es una función del pH de su entorno. Puede ser usada para evaluar la complejidad de extractos proteicos e identificar componentes de interés.

Exoma: Consiste en el conjunto de exones de un genoma. En el genoma humano la mayoría de los genes están formados por porciones denominadas exones, separadas por regiones espaciadoras denominadas intrones. Los exones dan lugar a las proteínas, mientras que los intrones tienen una desco-

nocida función espaciadora. Los exones, constituyen el 1% del genoma de una persona.

Exón: Región del ADN que se mantienen en el ARN mensajero (ARNm) maduro. En los genes que codifican proteínas, son los exones los que contienen la información para producir la proteína codificada por el gen. En estos casos, cada exón codifica una porción específica de la proteína completa, de manera que el conjunto de exones forma la región codificante del gen. El ARN inicialmente es una pieza muy larga, cuyas partes importantes son los exones. Hay un fragmento de ARN que se elimina, denominada intrón.

Florbetapir (AV45): Radiofármaco usado como herramienta para el diagnóstico de Alzheimer por su afinidad a la placa amiloide. Contiene el radioisótopo flúor (^{18}F) que decae a oxígeno (^{18}O) estable con un periodo de semidesintegración de aproximadamente 110 minutos.

Fluoróforo (o fluorocromo): Componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda (es decir, con menor energía).

Fluoróforo FAM: Tipo de sonda compuesta en el fluorocromo de tipo fluoresceína, la cual es usada frecuentemente en los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR).

Genome-wide association studies (GWAS): Método de análisis genético que implica el estudio de los genomas de muchas personas diferentes y la búsqueda de marcadores genéticos que se pueden utilizar para predecir la presencia de una enfermedad. Una vez que dichos marcadores genéticos son identificados, se pueden utilizar para entender cómo los genes contribuyen a la enfermedad y desarrollar mejores estrategias de prevención y tratamiento.

Haplotipo: Conjunto de alelos localizados en una región pequeña del cromosoma, que tienden a heredarse como un bloque a través de un linaje. Los haplotipos marcan segmentos cromosómicos reconocibles que pueden seguirse a lo largo de los linajes y entre las poblaciones.

Heterocigoto (heterocigosidad): Tener 2 alelos diferentes en un locus particular.

Homeostasis: Conjunto de fenómenos de autorregulación, que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo.

Homocigoto (homocigótico): Tener 2 alelos iguales o idénticos en un locus particular en un genoma diploide.

Intrón: Región del ADN que forma parte de la transcripción primaria de ARN, pero a diferencia de los exones, son eliminados del ARNm maduro, previamente a su traducción.

Isoformas: Productos proteicos distintos creados a partir del mismo gen. Por *splicing* alternativo la transcripción de un gen puede implicar a grupos diferentes de exones, resultando en distintas proteínas. Una isoforma es una de las distintas formas de la misma proteína. Las distintas formas de una proteína podrían ser generadas por genes relacionados, o podrían generarse por el mismo gen a través del proceso de *splicing* alternativo, o maduración diferencial (intrones-exones, acoplamiento y generación del RNA maduro). Un número importante de isoformas son debidas a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

Kilodalton (kDa): Unidad de masa ajena al Sistema Internacional utilizada para expresar la masa molecular, especialmente para moléculas grandes, como proteínas y polisacáridos. Es igual a 1000 daltons. Un dalton es igual a la doceava parte de la masa de un átomo de carbono-12, o $1,660 \times 10^{-27}$ kg.

Locus: En plural, “*loci*”. Se trata del lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen o una secuencia específica de ADN.

Pleiotropía (pleiotropismo): Fenómeno por el cual un solo gen determina diversas manifestaciones fenotípicas distintas y en apariencia no relacionadas.

Polimorfismo: Existencia de dos o más alelos con una frecuencia significativa en una población determinada. Puede afectar tanto a regiones codificantes como no codificantes del genoma, y consistir en la variación de un solo par de bases (ver polimorfismo de un solo nucleótido) o menos frecuentemente de hasta millones de pares de bases. La definición estricta de polimorfismo, es un lugar en la secuencia de ADN donde existe una variación, y la variante menos común está presente en, al menos, el 1% de la población analizada. Así se distingue un polimorfismo de una variante poco común que puede ocurrir en sólo una de cada 1.000 personas. Los polimorfismos pueden ser cambios de una sola letra, como una C en vez de T. Pero también podrían ser algo más complejo, como un tramo entero del ADN, el cual está presente o ausente. Éstas también pueden llamarse alteraciones o variaciones en el número de copias (VNC); pero todos son polimorfismos. Básicamente, es un término general para hablar de la diversidad en los genomas de una especie.

Polimorfismo de un Solo Nucleótido (SNP): Tipo de polimorfismo que produce una variación en un solo par de bases. Se refiere a los lugares en el genoma donde las personas son diferentes en un lugar específico. Aproximi-

madamente en una de cada 1.000 letras del código se encuentra uno de estos lugares. En éste, una persona puede tener una C y otra puede tener una T. Esto es lo que se llama un SNP. La mayoría de los SNP no tienen mucho significado, porque están en una parte del genoma que no tiene una función crítica. Sin embargo, algunos de ellos confieren un riesgo para algunas enfermedades.

Proteostasis: Actividad de una red de vías esenciales para la función y viabilidad celulares. Garantiza que la concentración, el plegamiento y las interacciones de las proteínas sean adecuados desde su síntesis hasta su degradación. *Sinónimo:* Homeostasis proteínica.

Puntuación de riesgo poligénico (PRP): Evaluación del riesgo de una afección específica teniendo en cuenta la influencia colectiva de muchas variantes genéticas.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico partiendo de una mínima cantidad de material de partida. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente. Esta técnica tiene un amplio campo de aplicaciones en el diagnóstico de virus, bacterias, enfermedades hereditarias, medicina forense o investigación básica y aplicada.

Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real (qPCR) o PCR cuantitativa: Se trata de una variante de la PCR convencional usada para generar un gran número de copias usando un molde de ADN como partida. Para ello emplean, un par de cebadores específicos, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), tampón de reacción y ADN polimerasa. A dicha mezcla, y como diferencia respecto a la PCR convencional, se le añade un fluoróforo que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición se realiza tras cada ciclo de amplificación, y es por esto que se le denomina PCR en tiempo real, inmediata o simultánea.

Reacción en Cadena de la Polimerasa con análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP): Técnica de biología molecular que nos permite detectar fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Esta técnica se basa en la acción de las enzimas de restricción, las cuales reconocen secuencias específicas de nucleótidos del ADN previamente amplificadas por PCR y hacen un corte en la cadena. Si exponemos dos cadenas que tengan diferentes alelos, el corte de la misma enzima nos va a producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes ya que los polimorfismos específi-

cos de cada alelo modificarán el reconocimiento por parte de la enzima y por ende, su capacidad de corte. En combinación con la electroforesis en gel o Southern Blot-se pueden apreciar patrones de bandeo diferenciales entre individuos según los alelos que presenten.

Sondas tipo TaqMan®: Son las sondas de hidrólisis diseñadas para incrementar la especificidad de la qPCR. Se basan en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa para escindir una sonda marcada ya hibridada a la secuencia diana. Esta escisión de la sonda permite la emisión de fluorescencia que permite obtener una medida cuantitativa altamente específica de la acumulación del producto durante los ciclos de PCR. Este tipo de sondas están formadas por un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de un oligonucleótido y un desactivador de fluorescencia en el extremo 3' (*quencher*).

Sondas mediante Transferencia de Energía Fluorescente mediante Resonancia (FRET): Sonda marcada con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor, y que se utiliza para identificación en los procesos de qPCR. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia. Las sondas FRET consisten en un par de oligonucleótidos que pueden unirse próximos en un ácido nucleico "blanco". El principio de actuación FRET depende de la estrecha proximidad entre los fluoróforos. Cuanto mayor sea la cantidad de DNA no específico presente, menor podrá ser la energía de transferencia.

Splicing (corte y empalme): Proceso mediante el cual los intrones, es decir, las regiones no codificadoras de los genes, son escindidos del transcrito de ARN mensajero primario y los exones (es decir, las regiones codificadoras) se unen para generar ARN mensajero maduro.

SYBR™ Green: Compuesto orgánico que forma parte del grupo de las cianinas asimétricas y que se utiliza y que tiene diferentes aplicaciones en biología molecular, entre ellas, como colorante para la cuantificación de ADN de doble cadena en la qPCR o para la visualización de ADN en electroforesis con gel de agarosa.

Temperatura de fusión (*Melting temperature - Tm*): Para el ADN, es aquella temperatura en la que el 50% del ADN tiene sus hebras separadas (desnaturalización del ADN).

Test Mini-Mental (MMSE): Test de evaluación de función cognitiva que se utiliza para detectar una posible demencia y/o para seguir la evolución de la misma.

Transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET): Mecanismo que describe la transferencia de energía entre dos cromóforos. El cromóforo donante, inicialmente en su estado electrónico excitado, puede

transferir energía a un cromóforo aceptor a través del acoplamiento dipolo-dipolo. La eficiencia de esta transferencia de energía es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre el donante y aceptor de FRET haciéndolo extremadamente sensible a pequeñas distancias.

Variaciones en el número de copias (VNC): Circunstancia en la que el número de copias de un segmento específico de ADN varía entre diferentes genomas individuales. Las variantes individuales pueden ser cortas o incluir miles de bases. Esas diferencias estructurales pueden haber aparecido por duplicaciones, deleciones u otros cambios, y pueden afectar tramos largos del ADN. Se trata de un tipo de variación estructural en la que un fragmento de ADN se duplica en algunas personas y, en ocasiones, incluso se triplica o cuadruplica. Al analizar esa región cromosómica, se observará una variación en el número de copias en personas normales. Algunas veces esas variantes del número de copias pueden incluir varios genes simultáneamente. Este fenómeno puede dar lugar a que la persona cuente con tres, cuatro o incluso 5 copias de ese gen en lugar de las habituales dos. Resulta ser bastante común, y en algunos casos, si los genes están involucrados en funciones que son sensibles a la dosis, pueden verse las consecuencias en términos de riesgo de enfermedades.

Introducción

La apolipoproteína E (apoE) es una glicoproteína implicada en la homeostasis del colesterol y metabolismo lipídico, la cual se sintetiza fundamentalmente en los hepatocitos y astrocitos. Se encuentra en el plasma y fluido cerebroespinal¹⁴.

La apoE es una proteína de 34 kDa (kilodaltons) compuesta por 299 residuos de aminoácidos. Está codificada por el gen *apoE*, el cual se ubica en el brazo largo del cromosoma 19 (*locus* 19q13.2). Este gen está compuesto por cuatro exones y tres intrones con una longitud total de 3.597 nucleótidos. El gen *apoE* se sabe que es de naturaleza polimórfica, consta de tres alelos comunes: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, cuya combinación da lugar a 6 genotipos diferentes (tres genotipos homocigotos: $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$ y tres heterocigotos: $\epsilon 3/\epsilon 2$, $\epsilon 4/\epsilon 2$ y $\epsilon 4/\epsilon 3$). Las proteínas resultantes sólo difieren en uno o dos aminoácidos en posición 112 y 158. El haplotipo apoE2 tiene una cisteína en las dos posiciones, el apoE3 tiene una cisteína en posición 112 y una arginina en la 158 y el apoE4 tiene una arginina en ambas posiciones (Tabla 1: Genotipos resultantes del gen *apoE*). Aunque la diferencia en la secuencia está limitada a un par de residuos, se sospecha que estos residuos influyen en las propiedades de las isoformas por alteración del dominio de interacción entre los dominios N (amino-terminal) y C (carboxilo-terminal); modificando las funciones de la proteína¹⁵.

Tabla 1. Genotipos resultantes del gen *apoE*

| RS429358 (CODON 112) | RS7412 (CODON 158) | ALELO |
|----------------------|--------------------|-------------------------|
| T/T | T/T | $\epsilon 2/\epsilon 2$ |
| T/T | C/C | $\epsilon 3/\epsilon 3$ |
| C/C | C/C | $\epsilon 4/\epsilon 4$ |
| T/T | T/C | $\epsilon 2/\epsilon 3$ |
| T/C | T/C | $\epsilon 2/\epsilon 4$ |
| T/C | C/C | $\epsilon 3/\epsilon 4$ |

Las diferentes formas alélicas de *apoE* son resultantes de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) presentes en las posiciones del nucleótido 334 (primer nucleótido del codón 112) y 472 (segundo nucleótido del codón 158), donde se sustituye una base timina (T) por una citosina (C) en estos dos sitios correspondientes del gen. Los SNPs se nombran como 334T/C y 472C/T. Las combinaciones 334T/472T (112Cys/158Cys), 334T/472C (112Cys/158Arg) y 334C/472C (112Arg/158Arg) constituyen los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ respectivamente de las isoformas del gen *apoE* y que combinadas ofrecen los 6 genotipos.

C: citosina. **T:** timina. **Cys:** cisteína. **Arg:** arginina.

Fuente: Martínez et al. 2020¹⁵.

La isoforma $\epsilon 3$ de apoE es la más común y representa aproximadamente el 80% de los alelos en humanos. En Europa presenta una prevalencia del 79% mientras que en otros continentes varía entre el 85% en Asia, hasta el 69% en África. El alelo $\epsilon 2$ presenta una prevalencia en humanos entorno al 5% y 10%; y el $\epsilon 4$ entre el 10% y el 15%. En Europa, hay un gradiente de distribución del alelo $\epsilon 4$, con una alta prevalencia en Europa del norte de entorno al 25% y una baja prevalencia en el área del Mediterráneo siendo inferior al 10%. La variabilidad encontrada en la distribución de los alelos de *apoE* a lo largo de los diferentes climas y poblaciones refleja las ventajas selectivas que los diferentes alelos muestran^{15,16}.

Históricamente, la mayoría de la investigación relacionada con la proteína apoE se ha centrado en el papel que juega modulando los riesgos de enfermedad cardiovascular (ECV) y la EA de aparición tardía. Sin embargo, los efectos comprobados de esta proteína con efecto pleitrópico extienden su función más allá de estas dos condiciones de salud; demostrando un papel a lo largo de un amplio espectro de condiciones biológicas, incluyendo su función en el tejido adiposo, obesidad, síndrome metabólico y diabetes, fertilidad, longevidad, función inmune y enfermedades infecciosas¹⁵.

El alelo $\epsilon 4$ se ha asociado con un riesgo aumentado de algunos desórdenes mentales, neurológicos y cerebrovasculares; con una asociación especialmente marcada con la Enfermedad de Alzheimer (EA). En contraste con el potencial patogénico de $\epsilon 4$, se ha informado que el alelo $\epsilon 2$ presenta un efecto protector frente al infarto de miocardio. Sin embargo, la presencia de este alelo se ha asociado con la Disbetalipoproteinemia familiar (DBLP) o incluso algunas evidencias sugieren su relación con el riesgo aumentando de padecer Parkinson o esclerosis múltiple¹⁴. No obstante, es relevante añadir que la presencia de los genotipos de riesgo para apoE no es condición necesario ni suficiente para el desarrollo de estas patologías, ya que se trata de condiciones multifactoriales donde es necesario la coexistencia de otros factores, como síndrome metabólico o resistencia a la insulina¹⁷.

1. Principales funciones del gen *apoE*

ApoE es una proteína multifuncional sintetizada y secretada por múltiples tejidos de mamíferos. Aunque los hepatocitos contribuyen aproximadamente al 75% de su contenido en la periferia, también se expresa en el tejido adiposo, riñones y las glándulas adrenales, entre otros tejidos. Del mismo modo se ha visto que en el cerebro se dan altos niveles de producción de apoE. Aunque las agrupaciones de apoE en cerebro y periferia son

diferentes, ambas comparten funciones sistémicas similares: regulación primaria del metabolismo lipoproteico y apoyo durante la diferenciación celular¹⁵.

ApoE está involucrada en modular la función sináptica, la integridad de la barrera hematoencefálica, reciclado de receptores neuronales, procesos fisiológicos (ensamblaje y estabilidad del citoesqueleto, función mitocondrial o función dendrítica); así como implicada en numerosas rutas metabólicas como el transporte lipídico, metabolismo de la glucosa y señalización de la insulina. También se une e interactúa con componentes inflamatorios como los lipopolisacáridos (LPS), beta-amiloide (A β), beta-glucanos y ácidos lipoteicoico. Se cree que esta función facilita la eliminación de moléculas inflamatorias y patógenas, lo que sugiere un papel de apoE en la inmunidad innata^{16,18}.

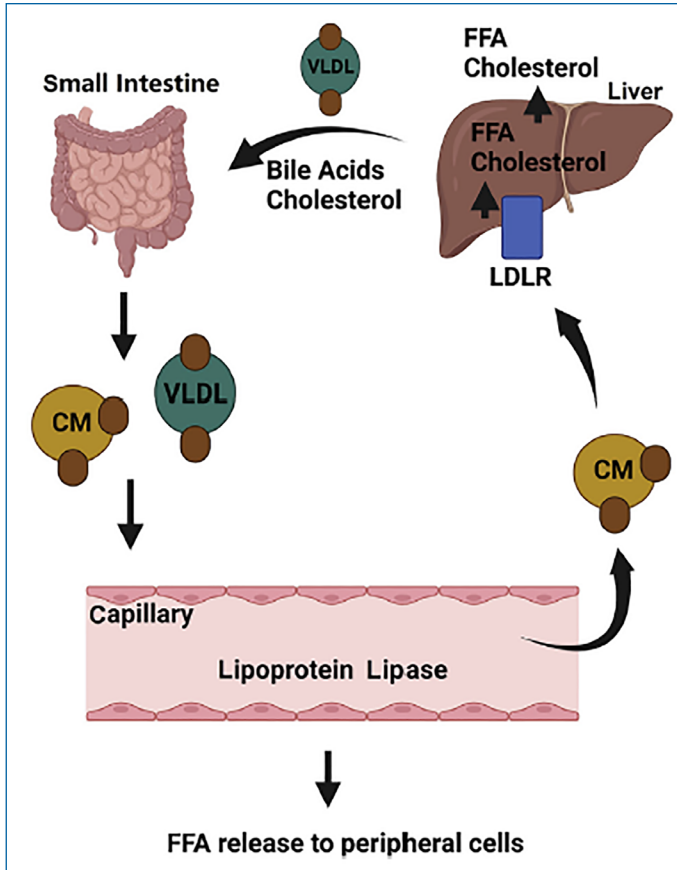
Este informe se centrará únicamente en el papel de apoE en el cerebro y en el metabolismo y transporte lipídico; por ser éstos los principales mecanismos asociados con las dos condiciones objeto de estudio (DBLP y EA).

1.1. ApoE y metabolismo lipídico

El principal papel en el que está implicada la proteína apoE es el transporte de lípidos por su asociación con los quilomicrones (CM) remanentes, VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad, “*Very low density lipoprotein*” por sus siglas en inglés) y las HDL (Lipoproteínas de alta densidad, “*High density lipoprotein*” por sus siglas en inglés). Durante la circulación, las VLDL y los CM son enriquecidos con apoE. Una vez tiene lugar la interacción con las células endoteliales, la lipoproteína lipasa hidroliza los triglicéridos almacenados en las proteínas apoE liberando ácidos grasos para el metabolismo energético^{15,16}.

ApoE regula el metabolismo lipídico anabólico y catabólico interactuando con los receptores de LDL (Lipoproteínas de baja densidad, “*Low density lipoprotein*” por sus siglas en inglés) para regular los niveles de LDL y VLDL. Niveles de síntesis de apoE aumentados están asociados con niveles superiores de síntesis y secreción de VLDL. La acumulación de apoE en lipoproteínas puede reducir la lipólisis de triglicéridos lo que conlleva la existencia de un mecanismo autoinhibitorio para la función de apoE, el cual es capaz de inducir la entrada y salida de colesterol desde las células. Tal y como se muestra en la figura 1 (Figura 1: *Transporte lipídico de apoE a lo largo de los diferentes tejidos*), apoE como proteína de transporte lipídica se integra en el metabolismo lipídico mediante diferentes tejidos y células¹⁶.

Figura 1. Transporte lipídico de apoE a lo largo de los diferentes tejidos



ApoE es secretado desde el hígado junto con las VLDL, el colesterol y los ácidos biliares. En el intestino delgado, *apoE* se combina con los CM y se libera con las partículas VLDL/*apoE*. Una vez en los vasos sanguíneos y gracias a la acción de la lipoproteína lipasa se libera *apoE* a partir de los FFA para su distribución hacia las células periféricas. CM/*apoE* son transportadas hacia el hígado donde LDLR liberan FFA y colesterol al hígado.

CM: Quilomicrones. **FFA:** Ácidos grasos libres (del inglés, "free fatty acids". **LDLR:** Receptores de lipoproteínas de baja densidad (del inglés, "Low density lipoprotein receptors". **VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés "Very low density lipoprotein").

Fuente: Troutwine et al. 2022¹⁶.

Los niveles de colesterol plasmático LDL están asociados con las 3 isoformas de *apoE*. La isoforma $\epsilon 4$ se une al receptor LDL con una afinidad ligeramente superior a $\epsilon 3$; mientras que la $\epsilon 2$ se une al receptor con una afinidad reducida. Estas alteraciones modulan el riesgo individual de aterosclerosis basada en la expresión alelo-dependiente de *apoE*¹⁶.

1.2. ApoE y cerebro

(Ver apartado: 2.3 Enfermedad de Alzheimer)

2. Enfermedades primarias asociadas al gen *apoE*

2.1. Enfermedad cardiovascular y aterosclerótica

La aterosclerosis representa la mayor causa de enfermedad cardiovascular (ECV) y la proteína apoE se encuentra abundantemente en las lesiones ateroscleróticas, la cual es secretada por los macrófagos que se encuentran en estas regiones. La producción de apoE es ateroprotectiva ya que contribuye al transporte reverso de colesterol, inhibiendo la proliferación de células musculares lisas, reduciendo la oxidación lipídica y restringiendo la agregación plaquetaria. Se ha reportado que la ausencia o disfunción de apoE da lugar a hiperlipidemia y lesiones ateroscleróticas, mientras que su inyección o sobre expresión hepática supone un factor protector¹⁵.

Los portadores del alelo $\epsilon 4$ tienen niveles más altos de lipoproteínas no-HDL debido principalmente a la reducida retirada de VLDL del plasma, lo que contribuye a un riesgo incrementado de aterosclerosis y ECV. Además, en presencia del alelo $\epsilon 4$ se incrementa el estrés del retículo endoplasmático en los macrófagos, lo que conduce a una función anómala de la mitocondria lo que a su vez contribuye a la inflamación. Esta combinación de factores hace que el riesgo de eventos cardiovasculares y aterosclerosis se vea incrementado¹⁵.

2.2. Disbetalipoproteinemia familiar

La DBLP o hiperlipoproteinemia tipo III (Ver anexo 1 y 2: Clasificación de las dislipemias según fenotipo lipídico y etiología, respectivamente) se trata de un trastorno lipídico que está asociado a la presencia del alelo $\epsilon 2$ en homocigosis. La DBLP se caracteriza por una acumulación en plasma de partículas remanentes de las lipoproteínas ricas en TG (triglicéridos), es decir, de las partículas resultado del catabolismo periférico de las VLDL y CM. La acumulación de estos remanentes se produce por una unión deficiente a sus receptores lo que se traduce en una eliminación ineficiente asociada a la existencia de determinadas variantes genéticas disfuncionales o en ausencia de apoE. Por lo que en esta situación se observa hipercoleste-

rolemia e hipertrigliceridemia con elevaciones de colesterol y TG. En consecuencia, se trata de una entidad que presenta un riesgo incrementado de enfermedad aterosclerótica prematura^{4,19,20}.

En torno al 50% de los pacientes con DBLP desarrollan xantomas cutáneos de tipo eruptivo o los de pliegues palmares. Otro tipo de xantomas como los tuberosos, tendinosos y los xantelasmas son frecuentes en los trastornos dislipémicos familiares mixtos, pero no son específicos de la DBLP. Las manifestaciones cardiovasculares más frecuentes en pacientes con DBLP son la enfermedad arterial periférica (prevalencia en torno al 11%) y la enfermedad arterial coronaria (prevalencia en torno al 19%). La resistencia a la insulina y la obesidad son también comunes en estos pacientes¹⁹.

La DBLP tiene un trasfondo genético y por tanto es hereditaria, aunque en la mayoría de los casos es un trastorno recesivo, de baja penetrancia. Esto se traduce en que, siendo una enfermedad genética, este desorden generalmente no se presenta en la familia. En el 90% de los casos, la base genética de la DBLP se presenta como homocigotos para el alelo $\epsilon 2$ (genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$). El otro 10% de los casos consisten en otras variantes genéticas, de las cuales se han descrito hasta 23, y que dan lugar a una DBLP de tipo autosómico dominante. Sólo entre el 10% y el 15% de las personas con un genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ acaban desarrollando DBLP específico más adelante en la vida. Esto implica que para su expresión es necesaria la confluencia de un estrés metabólico adicional; generalmente obesidad, resistencia a la insulina o diabetes mellitus²¹.

2.2.1. Epidemiología

La prevalencia de DBLP es variable dependiendo de la definición que se use para determinar la condición. Algunos estudios previos han diferido en la inclusión o exclusión del genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ junto con otros parámetros como valores del cociente en plasma de VLDL-colesterol/TG-plasmático $> 0,30$, TG /apolipoproteína B (apoB) y el cociente de colesterol total/apoB. Una de las definiciones establecidas sostiene que si un paciente tiene un nivel de colesterol por encima del percentil 90 junto con la presencia del genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ se considera que tiene un diagnóstico positivo para DBLP. Las estimaciones de prevalencia informadas en los diferentes estudios varían entre el 0,1% al 2,7% entre la población general en función del criterio diagnóstico que se establezca¹⁹.

2.2.2. Diagnóstico

• Métodos de determinación bioquímica

La evaluación inicial consiste en completar el estudio de un perfil lipídico, incluyendo la medida de los niveles de VLDL y las proteínas no-LDL. En

caso de alteraciones bioquímicas sospechosas y que además cuente con otras manifestaciones clínicas, es recomendable incluir pruebas genéticas con evaluación de apoE que incluya genotipado de $\epsilon 2/\epsilon 2$. Para descartar una posible variante autosómica dominante y así completar el diagnóstico, sería recomendable la secuenciación del gen *apoE*¹⁹.

El diagnóstico clásico de DBLP requiere de la presencia de un fenotipo específico de lipoproteínas obtenido por ultracentrifugación, conocido como “ β -cuantificación”. Aunque se trata de una técnica bastante fiable, sólo está disponible en algunos centros ya que el equipamiento necesario es relativamente costoso. Se trata de una técnica laboriosa donde además se requiere de un cierto nivel de experiencia para llevarla a cabo correctamente. Como alternativa a la ultracentrifugación, surgen diferentes tipos de determinaciones bioquímicas. Entre éstas se encuentra la electroforesis en gel de agarosa de lipoproteínas a partir de plasma/suero sin tratar, usando un tipo de colorante de tipo azoico. Sin embargo, aunque esta técnica es más sencilla, la presencia de la β banda en el gel no es un marcador lo suficientemente específico o sensible para el diagnóstico de DBLP. Por ejemplo, no permite hacer un diagnóstico diferencial respecto a la hiperlipoproteïnemia V, la cual también cuenta con un patrón de bandas β conteniendo CM y CM remanentes. Existen algunas evidencias que apuntan a que el uso de un gel de electroforesis en gradiente de acrilamida desnaturizante podría ser una opción más sensible y específica para la identificación de los pacientes DBLP. Sin embargo, la preparación de este tipo de geles es compleja, costosa y se trata de una técnica difícil de aplicar para la práctica clínica rutinaria⁴.

Otra de las opciones disponibles para el diagnóstico de la DBLP es la medida directa de concentración de apoE por técnicas inmunológicas. Entre estas técnicas se pueden encontrar ensayos comerciales de *enzyme-linked immunosorbent assay* (por sus siglas en inglés, ELISA) o turbidimétricos automatizados para ser usados fiablemente de forma rutinaria en el laboratorio⁴.

• Caracterización genética

Ya que la DBLP presenta un origen genético, se podría concluir que una prueba genética podría darnos el diagnóstico definitivo de inclusión o exclusión para aquellos pacientes con hiperlipidemia mixta. La confluencia de varios factores, como la baja penetrancia de la enfermedad o el hecho de que un 10% muestran un patrón de alelos autosómicos dominantes que no corresponde con el típico genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$; hacen que sea necesario la integración del resultado de diferentes pruebas, más allá que la caracterización del gen *apoE* para poder confirmar el diagnóstico⁴.

El método que originalmente más se ha usado para la determinación de las variantes de *apoE* ha sido la determinación por enfoque isoeléctrico (EIE). Esta técnica permite la caracterización fenotípica de apoE a partir de la cual se puede inferir su genotipo por separación de sus tres isoformas (E2, E3 y E4)⁴.

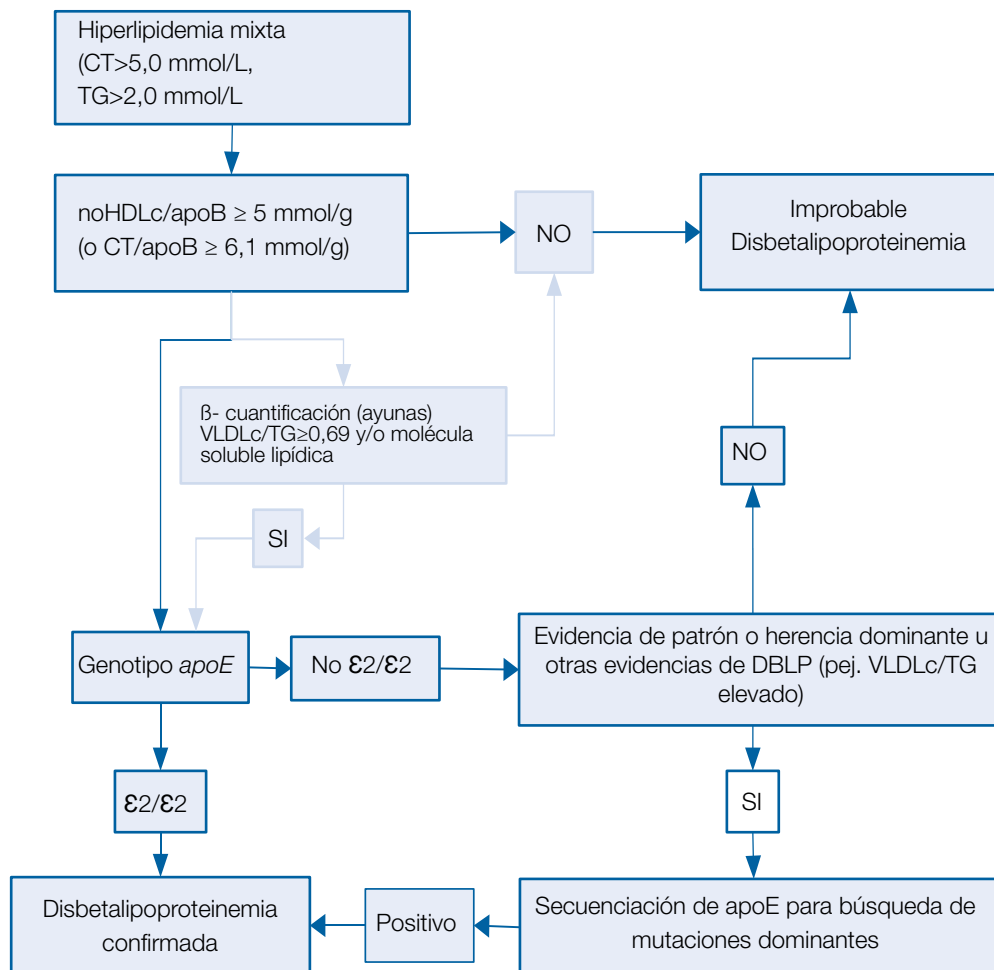
Los diferentes métodos de genotipado de *apoE* que se han desarrollado para cualquiera de las condiciones de estudio que resulten de interés, están expuestos en el apartado 3 (Apartado 3: Determinación molecular de los polimorfismos del gen *apoE*).

• Aproximación mediante diagnóstico combinado

Aunque la técnica más aproximada a considerarse el método de referencia en el diagnóstico de la DBLP lo constituye la β -cuantificación junto con la determinación del cociente colesterol VLDL/TG totales o colesterol VLDL/triglicéridos VLDL; se ha propuesto el uso de diferentes algoritmos diagnóstico con el fin de caracterizar a este tipo de pacientes⁴.

La DBLP está caracterizada por la presencia de lipoproteínas remanentes de origen intestinal, que no contienen apoB y que son ricas en colesterol. Por tanto, las concentraciones de apoB en este tipo de pacientes son relativamente bajas respecto a la concentración de colesterol total (CT) si se comparan con otras hiperlipidemias mixtas como la tipo IIa y la tipo IV; donde el colesterol está ampliamente presente en las LDL y VLDL, las cuales contienen apoB. La medida de apoB, por tanto, juega un papel relevante en la identificación de estos pacientes. Además, se trata de una determinación con un bajo coste y con un procedimiento muy simple de medida del cociente noHDLc (colesterol noHDL por sus siglas en inglés)/apoB o CT/apoB en un solo paso. En la figura 2 se muestra un ejemplo de algoritmo diagnóstico que se ha aplicado en gran cantidad de casos clínicos donde se incluye una determinación positiva de noHDLc/apoB o del cociente CT/apoB y el genotipo *apoE* (Figura 2: Ejemplo de algoritmo diagnóstico para la DBLP). Una de las recomendaciones para aquellos pacientes con hiperlipidemia mixta y que tengan un cociente aumentando de noHDLc/apoB o CT/apoB es la secuenciación completa del gen *apoE*. Es importante tener en consideración que los cocientes de apoB pueden verse alterados en aquellos pacientes que siguen un tratamiento hipolipemiente⁴.

Figura 2. Ejemplo de algoritmo diagnóstico para la DBLP



En caso de una determinación positiva del cociente noHDLc/apoB, se procede a realizar un test más específico. En aquellos centros donde esté disponible la β-cuantificación se recomienda incluirla ya que es útil para confirmar que el fenotipo DBLP está presente. En caso que la β-cuantificación no sea una técnica accesible, se procedería directamente con el test genético una vez los pacientes han sido clasificados conforme a apoB.

apoB: apolipoproteína B. **apoE:** gen de la apolipoproteína E. **CT:** colesterol total. **ε2:** alelo ε2 de apoE. **TG:** triglicéridos. **noHDLc:** colesterol noHDL "non-high density lipoprotein cholesterol". **VLDL-C:** colesterol de tipo VLDL "very low density lipoprotein cholesterol".

Fuente: modificada de Boot et al. 2020⁴.

2.2.3. Tratamiento

El tratamiento de la DBLP se fundamenta en una terapia combinada que incluya modificaciones en los hábitos de vida y tratamiento médico. Los pacientes con DBLP suelen responder excepcionalmente bien a la terapia basada en dieta, siendo uno de los principales objetivos la reducción en la ingesta de carbohidratos. En caso que estos cambios sean insuficientes para optimizar los niveles lipídicos, el uso de estatinas cuenta con un beneficio demostrado en mejorar los niveles de LDL¹⁹.

2.3. Enfermedad de Alzheimer

La demencia representa un conjunto de síntomas relacionados con el deterioro progresivo de la función cognitiva; incluyendo pérdida de memoria, problemas con la decisión ejecutiva, toma de decisiones, función del lenguaje y cambios en el comportamiento y el humor. La EA es una forma de demencia, llegándose a posicionar como el trastorno neurodegenerativo más prevalente. Los síntomas más comúnmente asociados a EA incluyen pérdida de memoria, dificultad para llevar a cabo las actividades diarias, problemas de comportamiento y de gestión emocional. La EA se caracteriza por presentar placas post mortem extracelulares de A β que conducen a la muerte celular cerebral y la formación de ovillos neurofibrilares, los cuales impiden un aporte de nutrientes esenciales a las células. Además, los pacientes con EA muestran un metabolismo cerebral de la glucosa reducido, disfunción mitocondrial, neuroinflamación, pérdida de proteostasis, cambios vasculares y resistencia a la insulina. Estas características no sólo se limitan a presentarse aisladamente en el cerebro de los pacientes con EA, sino también en la periferia. Este tipo de trastorno cuenta con 3 estadios principales: EA preclínico, deficiencia cognitiva leve y demencia. Normalmente la enfermedad progresa a EA grave, en la cual las personas llegan a ser dependientes de otras personas para su cuidado^{16,22,23}.

La apoE constituye la mayor apolipoproteína presente en el sistema nervioso central (SNC). En el cerebro, la mayoría de la síntesis del colesterol tiene lugar en los astrocitos, donde se da la mayor producción de apoE dentro del SNC. La regulación de la expresión de *apoE* está mediada por la activación de la microglía, así como también en otros tipos de células como las neuronas y los oligodendrocitos. Las distintas isoformas de apoE difieren en su papel a la hora de activar la liberación de colesterol a las células circundantes. La isoforma apoE4 en el fluido cerebroespinal se asocia con lipoproteínas de apoE más pequeñas, las cuales promueven una liberación menos eficiente que apoE3, mientras que apoE2 tiene una alta eficiencia en

la liberación de colesterol. Además de la homeostasis lipídica, las isoformas de apoE pueden regular múltiples vías implicadas en el desarrollo neural, plasticidad y reparación neuronal¹⁵.

El gen $\epsilon 4$ es el mayor factor de riesgo genético asociado a la EA de aparición tardía. Además, influye en el riesgo y resultados tras un ictus, daño cerebral traumático (mediante la alteración de la barrera hematoencefálica), esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson o demencia frontotemporal. En poblaciones con EA, la proporción de alelos $\epsilon 4$ se encuentra sobre representada, aproximadamente entre el 60 y 80% de los sujetos afectados con EA portan el alelo $\epsilon 4$. Además, el riesgo de EA es dosis dependiente de este alelo. Aquellos que portan un alelo $\epsilon 4$ tienen entre 2 y 3 veces más riesgo de EA, mientras los que llevan dos alelos $\epsilon 4$ tiene entre 10 y 15 veces más riesgo de desarrollar EA. Contrariamente, la presencia de uno o dos alelos $\epsilon 2$ presentan un riesgo reducido de EA^{16,24}.

La mayor parte de la investigación del gen *apoE* en la EA se ha centrado en cómo las diversas isoformas interactúan con la vía amiloide, regulando la síntesis y eliminación de la A β . Los mecanismos implicados en esta disfunción neuronal parecen ser principalmente dos: 1) $\epsilon 4$ acelera la deposición de A β en balsas lipídicas ricas en colesterol y 2) $\epsilon 4$ altera la señalización del receptor de apoE para disminuir la protección contra la acumulación de amiloide. En el SNC, la isoforma E4 estimula la fosforilación de la proteína tau, lo que conduce a la alteración del citoesqueleto celular. La inflamación es otra característica importante de la EA. La presencia del alelo $\epsilon 4$ se asocia con una mayor producción de citocinas proinflamatorias en el SNC, lo cual está relacionado con el fenotipo microglial disfuncional prevalente en la EA. También se ha demostrado una regulación de la integridad de la barrera hematoencefálica dependiente de alelo. Por lo tanto, el papel del gen *apoE* en la EA es claramente multifactorial; incidiendo no sólo en la hipótesis de la cascada amiloide, sino también en muchas de las otras características principales de la enfermedad. La presencia de apoE tanto a nivel periférico como en SNC comparten la tarea del mantenimiento de la salud a nivel neurológico¹⁵.

Con el objetivo de identificar genes/*loci* adicionales para el EA de inicio tardío, se han llevado cabo estudios de asociación de genoma completo (GWAS, de sus siglas en inglés “*Genome-Wide Association Studies*”). No obstante, y con excepción de la región *apoE*, no se han encontrado otras asociaciones significativas más allá de los primeros estudios publicados entre los años 2007 y 2008. Serían necesarios un mayor número de casos y controles que permitieran detectar pequeñas diferencias en comparación con el gran efecto que se ha demostrado para la variante apoE4²⁵.

2.3.1. Epidemiología

La EA es una enfermedad neurodegenerativa compleja y multifactorial la cual representa entre el 60% a 80% de los casos de demencia, y está caracterizada por pérdida de sinapsis y muerte neuronal. Un pequeño número de personas (5% a 10%) desarrollan EA a una edad más temprana y, debido a esta variación en la edad de inicio, la enfermedad se clasifica en EA de inicio temprano (< 60 años) y EA de inicio tardío (\geq 60 años). Debido a su largo curso clínico, pasando de una etapa leve a moderada y grave, la EA es un importante problema de salud pública en todo el mundo. En promedio, una persona con EA puede sobrevivir de 4 a 8 años después del diagnóstico, pero algunas personas pueden llegar hasta los 20 años. Se calcula que hay más de 50 millones de personas en todo el mundo que viven con EA o demencia, y se prevé que este número aumente a 152 millones en 2050²⁵.

La prevalencia de la EA aumenta drásticamente después de los 60 años: 5 % en el grupo de edad de 65 a 74 años, 14 % en el grupo de edad de 75 a 85 años y 35 % en el grupo de edad de 85 años o más. La prevalencia de EA de inicio tardío es mayor en mujeres. El riesgo estimado de EA entre mujeres y varones estadounidenses se ha cuantificado en torno al 20% y 10% respectivamente. Ahora bien, esta diferencia biológica entre hombres y mujeres podría deberse al “*efecto de supervivencia*” (las mujeres viven más que los hombres y la edad avanzada es el mayor riesgo de EA) o al “*sesgo de supervivencia*” (los hombres que sobreviven más allá de la edad de 60 años tienen un perfil cardiovascular más saludable que las mujeres y, por lo tanto, tienen un menor riesgo de EA)²⁵. Las mujeres heterocigotas portadoras de un alelo $\epsilon 4$ tienen un riesgo similar de EA que los hombres homocigotos para este alelo. Parece que la menopausia o la pérdida de estrógenos juega un papel en el aumento del riesgo de EA asociado a $\epsilon 4$ ¹⁶.

Los estudios realizados en España han puesto de manifiesto tasas anuales de incidencia de EA similares a las de otros países europeos, con un claro incremento con la edad. En ámbitos rurales y población de 75 años o más, la incidencia de EA se estimó en 10,8 casos nuevos por 1000 habitantes-año, en población de 65 años o más en torno a 7,4 casos por 1000 habitantes-año y en población urbana de 55 años o más, de 5,4 casos por 1000 habitantes-año²⁶.

2.3.2. Diagnóstico

La *International Working Group* propone la realización de un diagnóstico de la EA clínico-biológico, que requiere la presencia de un fenotipo clínico

específico de la EA (fenotipo positivo^a) y pruebas de la existencia de biomarcadores de la patología de la EA (amiloide positivo y tau positivo)²⁷. Se han propuesto numerosas pruebas para el diagnóstico de EA en los estadios más iniciales de la enfermedad. Éstas incluyen cuestionarios del estado cognitivo del paciente, técnicas de imagen, biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR) y olfatorios, pruebas en saliva y sangre, en retina y oculares. Algunos, de uso en la práctica clínica y, otros siguen en investigación²².

Se propone una clasificación de biomarcadores fisiopatológicos o de diagnóstico (aumento de la retención fibrilar amiloide observada por tomografía por emisión de positrones (PET) o disminución del péptido A β ₁₋₄₂ y elevación de las proteínas t-tau y p-tau en el LCR) y biomarcadores de neurodegeneración o topográficos (disminución del metabolismo temporoparietal en la PET-FDG y atrofia temporal medial en la IRM)²⁸.

a) Cuestionarios y pruebas de la función cognitiva

Se dispone de pruebas cognitivas para el diagnóstico de la EA, como el *General Practitioner Assessment of Cognition* (GPCOG), el *Memory Impairment Screen* (MIS), el *Mini-Cog*, el *Mini-Mental State Examination* (MMSE), el *Clinical Dementia Rating scale–Sum of Boxes* (CDR–SB) o el *Alzheimer's Disease Assessment Scale–Cognitive Subscale* (ADAS-Cog).

Estas pruebas cognitivas se utilizan también para monitorizar los cambios cognitivos posteriores al diagnóstico y para determinar la efectividad del tratamiento. Pueden realizarse en la etapa temprana de deterioro cognitivo, sin que tengan utilidad en personas que no muestran síntoma alguno. En entornos de investigación, los biomarcadores como A β y tau, o las imágenes, se usan para determinar a personas con EA “preclínica” (no muestran síntoma alguno)²².

^a Fenotipos comunes de la EA: síndrome amnésico de tipo hipocampal, variante de atrofia cortical posterior y la variante logopéica afasia progresiva primaria. En las personas que tienen estos fenotipos comunes, la positividad de los biomarcadores amiloide y tau establece un diagnóstico de EA. Se requiere la positividad de los biomarcadores amiloide y tau porque un fenotipo amnésico con solo positividad amiloide no es específico de la EA y se observa en otras enfermedades neurodegenerativas con copatología amiloide (incluyendo la encefalopatía TDP-43 relacionada con la edad predominantemente límbica y la demencia con cuerpos de Lewy) o en pacientes con angiopatía amiloide cerebral y deterioro cognitivo vascular amnésico. Otros fenotipos: variante conductual o variante disejecutiva, variante corticobasal y las otras variantes de afasia primaria progresiva, están menos comúnmente relacionados con la patología de la EA. Estos fenotipos pueden o no interferir con la independencia en las actividades cotidianas. Los fenotipos poco comunes con biomarcadores positivos de la EA no deben clasificarse a priori como una EA establecida; en tales casos, el médico podría considerar que la EA no es la patología dominante que impulsa el fenotipo clínico, sino solo una copatología.

b) Biomarcadores establecidos de neurodegeneración y EA

Marcadores de imagen: Una de las técnicas de imagen que se suele emplear es la imagen por resonancia magnética (IRM). Habitualmente, la EA muestra un patrón característico de daño cerebral, motivo por el que, en las etapas tempranas, se buscan marcadores de imagen de atrofia del tejido cerebral del hipocampo mediante IRM. Otras regiones que se pueden observar debido a su asociación con la EA son la corteza entorrinal (localizada en el lóbulo temporal medio) y la amígdala. Otra opción para la IRM es examinar el grosor cortical de las regiones del cerebro, generalmente en las regiones temporal, orbitofrontal y parietal del cerebro. A pesar de que las imágenes del hipocampo se consideran un marcador de EA bien establecido para el diagnóstico inicial de deterioro cognitivo leve (DCL), se debe tener presente que el volumen reducido del hipocampo también se asocia con otros trastornos cerebrales, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la epilepsia²².

Otras de las pruebas de imagen es la PET. La PET amiloide y PET-tau emplean un radiofármaco que, inyectado en el cuerpo de la persona y tras la unión a las moléculas específicas de interés presentes en el cerebro, permite la obtención de imágenes mediante la captación de la radiación que emite el radiofármaco, indicando que la molécula de interés está presente en el cerebro. Otra variante es la exploración PET con fluorodesoxiglucosa (FDG). Su empleo permite determinar la cantidad de glucosa en el cerebro, lo que puede indicar la extensión del daño nervioso²².

Biomarcadores presentes en LCR: Su uso podría ser más útil que otros marcadores presentes en sangre por su relación con el cerebro y su relativa separación del resto del cuerpo a través de la barrera hematoencefálica. Incluyen la detección de la deposición de $A\beta_{1-42}$, formación de tau tangle ([P-tau181, proteína tau fosforilada en treonina posición 181) y pérdida de función neuronal (t-tau). El marcador $A\beta_{1-42}$ se reduce a través del curso de la enfermedad, mientras que t-tau y P-tau 181 se incrementan. Si todos estos biomarcadores se encuentran dentro de los valores normales, pueden ayudar a descartar EA. Aunque se trata de un método altamente sensible y específico, no tiene valor diagnóstico por sí sólo y únicamente se recomienda para aquellos que presenten síntomas²².

c) Biomarcadores de neurodegeneración en fase experimental

Entre los biomarcadores sanguíneos que se están comenzando a usar, destacan aquellos basados en la detección $A\beta$. La prueba PrecivityAD® (C2N Missouri, EEUU) se comercializa en EEUU. Este test identifica el genotipo *apoE* y el cociente $A\beta_{42/40}$ para determinar la probabilidad de

padecer EA. Otro de los test que ha recibido la aprobación de la *Food & Drug Administration* (FDA) como dispositivo innovador es la plataforma Soba™-Ad (AltPep, EEUU)²⁹. Esta prueba está diseñada para detectar las formas tóxicas del péptido Aβ en sus primeras etapas de EA. El test AlzoSure® (Diadem, EEUU)³⁰ que también cuenta con la aprobación desde el año 2022 por la FDA como dispositivo innovador, se trata de un ensayo en sangre con valor pronóstico para predecir la aparición del EA²².

Otros biomarcadores sanguíneos que se están estudiando incluyen: las especies Aβ en plasma (péptidos Aβ, cociente péptido Aβ), formas de la proteína tau, biomarcadores de inflamación, exosomas (micro RNAs, biomarcadores de resistencia a la insulina), biomarcadores genómicos y celulares o su uso combinado. Otras opciones incluyen biomarcadores genéticos (genes familiares como el gen *apoE*, APP, PSEN1 o PSEN2) o combinaciones de éstos para determinar el riesgo de padecer EA. Estos genes, que influyen en el riesgo de padecer EA son los denominados “genes de susceptibilidad” y su determinación se lleva a cabo para calcular el riesgo de desarrollar EA, pero no son biomarcadores de diagnóstico²².

Es importante mencionar que los biomarcadores en sangre no muestran resultados tan concluyentes como aquellos llevados a cabo a partir de LCR. En ocasiones este tipo de biomarcadores no son específicos para EA, se encuentran en menor concentración comparados con los del LCR y también hay que tener en cuenta la naturaleza intrínseca de la muestra de sangre donde, también hay presentes otros componentes que pueden alterar las concentraciones de los mismos. Además, la presencia de otras comorbilidades puede influenciar los valores de estos biomarcadores en sangre²².

d) Otras tecnologías emergentes

Los biomarcadores basados en el perfil lipídico, olfativos, test de saliva, test ocular o algoritmos basados en inteligencia artificial se encuentran todavía en estadios muy iniciales de investigación por el que no se describen con mayor detalle²².

2.3.3. Tratamiento

Actualmente no hay un tratamiento médico curativo para esta enfermedad. Todos los tratamientos disponibles son de tipo paliativo con el objetivo de tratar los síntomas, como la agitación, la depresión o los síntomas psicóticos. Los tratamientos comúnmente prescritos incluyen inhibidores de la colinesterasa, inhibidores de glutamato, la combinación de medicamentos y otras intervenciones no médicas³¹.

Los tratamientos médicos actuales para el tratamiento de EA de leve a moderado son los inhibidores de la acetil-colinesterasa (galantamina, donepezil). Las personas que sufren esta enfermedad tienen niveles bajos de acetilcolina, un neurotransmisor importante del cerebro involucrado en la comunicación entre las neuronas. Los inhibidores de la colinesterasa retardan la degradación metabólica de la acetilcolina y proporcionan una fuente adicional de este componente químico para la comunicación entre las células. Esto ayuda a retrasar la progresión del deterioro cognitivo y puede ser efectivo para algunos pacientes^{23,31}.

Otros fármacos conocidos como inhibidores de glutamato (memantina), protegen las células del cerebro mediante la regulación de un químico vinculado con la comunicación neuronal, llamado glutamato, que se libera en grandes cantidades por las células dañadas en las personas con EA. El glutamato está normalmente involucrado con el aprendizaje y la memoria, pero cuando se libera en exceso por las células dañadas, se adhiere a receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) que a su vez aceleran el daño celular. Este tipo de medicamentos se suele usar en pacientes con EA moderado a grave^{23,31}.

Existe un medicamento aprobado por la FDA (donepezil y memantina) que combina inhibidores de la colinesterasa e inhibidores del glutamato. Éste previene la descomposición de la acetilcolina en el cerebro y, tiene un efecto protector de las células nerviosas del cerebro frente a cantidades excesivas de glutamato. Este tipo de fármaco se usa para tratar los síntomas moderados a graves de EA^{23,31}.

En julio de 2023, la FDA aprobó por la vía tradicional³² el uso de un anticuerpo lecanemab³³ dirigido contra la A β para el tratamiento de la EA tras la autorización en 2021 de otro anticuerpo denominado aducanumab. Inicialmente, estas aprobaciones se realizaron en el marco del programa de aprobaciones aceleradas, basándose únicamente en la disminución de A β , estimada mediante PET en los cerebros de pacientes que tomaban el fármaco en comparación con el placebo³⁴. Otro de los anticuerpos presentados es donanemab^{35,36} que, en enero de 2023 vio rechazada su solicitud de aprobación por la FDA a través de la vía acelerada.

Todos estos medicamentos descritos para el tratamiento paliativo del EA se deben tomar con precaución por la gran cantidad de efectos adversos que presentan. Además, a medida que la enfermedad progresa la eficacia de esta medicación se suele ver reducida^{23,32,37-40}.

Ya que los cambios que tienen lugar con el transcurso de esta enfermedad, como la formación de placas, son irreversibles; la mayoría de la investigación se ha enfocado en el desarrollo de un tratamiento precoz antes de

que el cerebro se vea dañado²². Se han optimizado algunas aproximaciones dirigidas al gen *apoE* con el objetivo de alterar los niveles lipídicos de apoE usando diferentes abordajes: uso de oligonucleótidos antisentido (con capacidad para alterar la expresión del ARN mensajero (ARNm)), moduladores de la estructura o de anticuerpos anti-apoE. El uso de anticuerpos dirigidos hacia apoE ha demostrado resultados positivos en modelos animales, pero todavía no se ha probado en clínica¹⁶.

Debido a la gran carga social, económica y emocional que conlleva la EA, junto con la imposibilidad de ofrecer un tratamiento curativo; se ha considerado de interés la inclusión de un apartado específico sobre el impacto de la EA.

2.3.4. Impacto de la EA

En el “*Plan Integral de Alzheimer y otras Demencias (2019-2023)*” publicado por el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social se aborda las demencias, entre las que destaca la EA como la más prevalente. En este documento, las demencias son descritas como un problema social y sanitario de primer orden como consecuencia de la confluencia de varios factores relativos a la dimensión y alcance de las mismas; así como sobre su elevado impacto económico y social para las personas afectadas, sus cuidadores y el conjunto de la sociedad⁴¹.

Los principales factores que condicionan el elevado impacto de las demencias son los siguientes:

- Alta prevalencia de las demencias a nivel mundial. Según los datos que aporta la OMS, en el año 2015 la EA y otras demencias afectaban a 47 millones de personas en todo el mundo (en torno al 5% de la población mundial de edad avanzada). Teniendo en cuenta la mejora de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población; se prevé que esa cifra siga aumentando, llegando a 75 millones en 2030 y a 132 millones en 2050⁴¹.
- Constituyen una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores. La EA es responsable del 11,9% de los años vividos con discapacidades debidas a enfermedades crónicas⁴¹.
- Tienen un fuerte impacto en el entorno familiar, en particular, en quien ejerce las funciones de cuidador/a principal que, sufre muy a menudo sobrecarga y desestructuración en distintos ámbitos de su vida personal, social y laboral. Según los datos que aporta la OMS los costes relacionados con la EA se reparten entre la aten-

ción provista por la familia (85%) y la atención cubierta por los sistemas sociales y sanitarios (15%). De acuerdo a un estudio realizado por Confederación Española de Alzheimer (CEAFA), el coste medio anual del cuidado de una persona con alzhéimer es de 31.890 euros. Los costes directos de la enfermedad suponen casi una cuarta parte de los mismos, entre pruebas diagnósticas, visitas médicas, hospitalizaciones, medicamentos y cuidados a largo plazo en el domicilio o en una residencia. El resto de los costes son los indirectos, que incluyen la formación de personal de apoyo para su capacitación en el cuidado de las personas con EA, pero también los derivados de la pérdida de productividad, de tiempo, de oportunidades de empleo y de sueldo asociado a la atención que deben proporcionar los y las cuidadoras⁴¹.

2.4. Consideraciones generales

A nivel genérico, aunque los almacenamientos de apoE a nivel de circulación periférica y cerebro son independientes, jugando un importante papel en un amplio espectro de sistemas biológicos; algunos de ellos comparten similares mecanismos. Las alteraciones en el transporte lipídico, metabolismo celular y función inmune se superponen y actúan sinérgicamente a ambos lados de la barrera hematoencefálica para promover la extensión del efecto de apoE en los tejidos, sistemas y en las diferentes enfermedades relacionadas con este gen¹⁵.

Una de las áreas en las cuales la presencia de diferentes isoformas de apoE pueden llevar a cambios patológicos en multitud de desórdenes a nivel central y de periferia, es la alteración de la homeostasis energética o función mitocondrial. Entre las diferentes líneas de investigación que apoyan la disfunción mitocondrial como uno de los posibles puntos de unión de apoE con las diferentes condiciones con las que se le relaciona; se ha estudiado la implicación de un metabolismo deficiente de la glucosa. Se ha visto que este déficit está relacionado principalmente con el síndrome metabólico o diabetes, pero también con las enfermedades cardiovasculares o la propia EA¹⁵.

Otro de los mecanismos que subyace en las diferentes enfermedades donde apoE presenta un papel determinante es en la presencia de inflamación. La respuesta inflamatoria es crítica para que el organismo tenga la capacidad de responder y eliminar patógenos. Sin embargo, la existencia de inflamación generalizada es algo que está presente en los cerebros que desarrollan neurodegeneración. La respuesta periférica inflamatoria también

está modulada por apoE, como es el caso de infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus herpes simple (VHS)¹⁵.

En conclusión, los efectos de apoE son numerosos y diversos y, pese a su enorme diversidad, que abarca desde funciones en el tejido adiposo, la fertilidad, enfermedades infecciosas y neurológicas, parece que en todas ellas subyace un mecanismo de acción unificado¹⁵.

3. Determinación molecular de los polimorfismos del gen *apoE*

Como reflejo de la importancia biológica y clínica de las distintas isoformas del gen *apoE*, se han desarrollado técnicas de fenotipado y genotipado para su caracterización. Originalmente el examen fenotípico de las variantes se llevó a cabo mediante el EIE o electroforesis bidimensional, lo cual proporcionó información básica sobre la complejidad estructural y funcional de la apoE, pero los métodos de fenotipado son técnicamente exigentes y propensos a errores de clasificación. Entre los inconvenientes que presenta, por ejemplo, es la cantidad de plasma o sueros que requiere y que limita el método, además de la posibilidad de formación de artefactos debido a su almacenamiento prolongado y que la clasificación errónea de los fenotipos apoE puede deberse a modificaciones postraduccionales de la proteína apoE y por interferencia del amiloide serico⁴².

Posteriormente se desarrollaron métodos para la determinación genotípica de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) de *apoE*: sistema de mutación refractario de amplificación (ARMS del inglés “*amplification refractory mutation system*”), polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP del inglés “*single strand conformation polymorphism*”), sondas de oligonucleótidos específicas de alelo (ASO del inglés “*allele-specific oligonucleotide probes*”), análisis de enzimas de restricción y en la técnica de generador heteroduplex universal” (UHG del inglés “*universal heteroduplex generator*”) basado en el diseño de una molécula de ADN (ácido desoxirribonucleico) que es una copia amplificable de la secuencia objetivo que contiene modificaciones de la secuencia estratégicas en las proximidades del punto de mutación⁴².

A pesar de que se han descrito varios métodos para el genotipado de *apoE*, todos ellos tienen limitaciones y desventajas para la detección de alteraciones de *apoE* en estudios de detección a gran escala poblacional. Por ejemplo, aunque el método ASO es sensible, precisa de mucho tiempo y requiere el marcaje de la sonda de oligonucleótidos con radioisótopos. SSCP

implica el uso de radioisótopos o tinción de plata, que resulta tediosa para la detección de patrones de bandas, que también son muy sensibles a las condiciones en las que se ha llevado a cabo el procedimiento. El método ARMS no implica marcaje con radiactividad, y los geles se pueden teñir fácilmente con bromuro de etidio (EtBr), pero para cada muestra se deben realizar cuatro series de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR: “*Polymerase Chain Reaction*”)⁴². Hoy en día, en el laboratorio clínico, la técnica ARMS se usa por detección fluorescente con electroforesis capilar, que ha sustituido al EtBr^b.

Sin embargo, una de las principales ventajas del genotipado de *apoE* sobre el fenotipado es la estabilidad del ADN cuando se almacena a -80°C. Uno de los métodos tradicionalmente usados es la reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP por sus siglas en inglés). Esta técnica precisa de la realización de una PCR seguida de una digestión con la enzima de restricción HhaI. Sin embargo, esta técnica es costosa y presenta dificultades en la discriminación de los diferentes genotipos ya que el patrón de bandas resultante se diferencia escasamente entre los dos genotipos, o también con muestras que se han amplificado débilmente. En estos casos, los heterocigotos pueden ser difíciles de discriminar porque el fragmento que lo diferencia es pequeño y en una PCR con una señal de amplificación muy sutil puede pasar inadvertido. Por otro lado, el análisis de los productos de digestión requiere de la elaboración de un gel de acrilamida, limitando el número de muestras que se pueden procesar a la vez^{42,43}.

Aunque el método UHG de genotipado es más rápido (20 minutos) y se eliminan los problemas de posibles digestiones parciales en comparación con el método con enzimas de restricción (varias horas); ambos requieren la separación de fragmentos en un gel y tienen limitaciones similares relacionadas con la carga y la visualización, aunque los patrones de UHG son más fáciles de interpretar. Ya que los patrones se deben a la presencia de 2, 3 y 4 bandas de igual intensidad en cada carril de la electroforesis, no hay riesgo de infragenotipado debido a que alguna de las bandas esté por debajo del límite de detección, como ocurre con la PCR y la digestión con la enzima HhaI⁴². La técnica de PCR convencional seguida de secuenciación o espectrometría de masas es un método efectivo usado para la genotipificación de *apoE*; sin embargo requiere de equipamiento y/o fungible costoso para su detección además de personal especializado⁴⁴.

^b Nota de la coautora Silvia Izquierdo Álvarez.

3.1. Genotipado por PCR a tiempo real

La tecnología de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés) se ha convertido en los últimos años en el método diagnóstico más demandado por su alta sensibilidad, fiabilidad, buena reproducibilidad y amplio rango dinámico a partir de gran variedad de muestras biológicas incluso con calidad deficiente. Su principal limitante ha sido su coste relativamente alto, el que sin duda se debe disminuir para generalizar su uso en la práctica clínica. Se trata de una técnica “*in vitro*” que permite la obtención de un gran número de copias de un fragmente de ADN a partir de una pequeña cantidad de muestra inicial. Es una técnica ampliamente usada en la identificación de virus, bacterias, medicina forense o diagnóstico de enfermedades hereditarias. En el caso de la qPCR además de necesitar un par de cebadores enfrentados que flanqueen a la región de interés, es necesario la incorporación de una sonda fluorescente. La adición de esta sonda permite la continua monitorización de la acumulación altamente específica del producto amplificado en cada ciclo, la cual es directamente proporcional a la intensidad de la señal del fluorescente. Para la detección de la luz emitida por el fluoróforo es necesario contar con un termociclador que lleve incorporado un detector de fluorescencia. Las principales ventajas de la qPCR comparadas con la PCR estándar son la reducción del tiempo del ensayo, menor riesgo de contaminación, ya que no precisa de análisis post-PCR y la mejora en sensibilidad y especificidad⁴⁵.

Los productos de detección por qPCR disponibles en el mercado han evolucionado progresivamente a una mayor sencillez, derivándose a formatos cada vez más compactos y sencillos que minimicen los pasos necesarios de pipeteo. Consecuentemente, se evitan los frecuentes errores en la dispensación, lo que acaba generando una incertidumbre acerca de la reproducibilidad de la técnica empleada, incertidumbre especialmente preocupante en el diagnóstico humano. La mayoría de las casas comerciales suelen ofrecer mezclas de reacción (llamadas MasterMix) que incluyen la Taq polimerasa, los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y las sales necesarias a concentraciones optimizadas conforme al tipo de enzima que se esté usando. El usuario ha de añadir los cebadores-sonda específicos y la muestra (ADN previamente purificada y aislada). El método habitual de transporte y conservación de todos estos reactivos que incluyan las enzimas Taq polimerasas comprende su congelación a -20°C, de esta forma se puede preservar su actividad durante varios meses sin apenas pérdida de la actividad.

En la figura 3 (Figura 3: Flujo de trabajo básico para la determinación por qPCR en un laboratorio de biología molecular) queda reflejado de forma esquemática cómo es el procedimiento a nivel genérico de este tipo de

tecnología en un laboratorio con la técnica implantada. El tiempo estimado entre la extracción del ADN y la obtención de resultados varía de 1 hora y media a 2 horas en función de los reactivos que se estén usando y del equipo. A esto hay que añadir la necesidad de interpretar los resultados que nos oferta el software del equipo.

Figura 3. Flujo de trabajo básico para la determinación por qPCR en un laboratorio de biología molecular



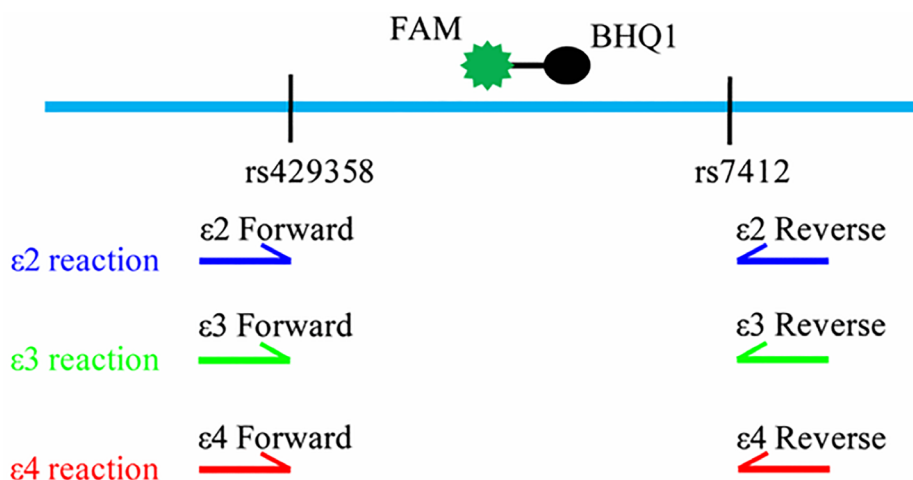
En primer lugar, se procede a la recolección y almacenamiento de la muestra a 4°C o -20°C en función del tiempo previsto hasta su procesado o las características intrínsecas de la muestra. A continuación, esta tecnología requiere tener puesto a punto un sistema para la extracción de ácidos nucleicos (DNA/RNA en función de su aplicación). El sistema de extracción puede ser de tipo manual o automático, según disponibilidad del laboratorio o preferencias del usuario. El siguiente paso es llevar a cabo la mezcla de reactivos y adición de la muestra, así como colocar los tubos en el termociclador de elección. Esta etapa se conoce como “set-up” de la PCR. Por último, y gracias al detector de fluorescencia y el software de interpretación que lleva incorporado el equipo, se puede hacer una lectura a tiempo real de la fluorescencia emitida (eje Y) en función del número del ciclo en el que se encuentre la reacción (eje X). Otras variantes de esta tecnología, permiten obtener otro tipo de representaciones gráficas como, por ejemplo, las denominadas “high resolution melting” que permiten la diferenciación entre SNP.

Nota: Los equipos y kits comerciales que se muestran a modo de ejemplo en esta figura corresponden con el kit de extracción manual de ADN “QIAamp, Qiagen™”, el extractor automático “QIACube connect, Qiagen™”. El modelo de termociclador corresponde con el sistema “QuantStudio 5qPCR, Applied Biosystems™”.

Fuente: Elaboración propia. Elena de Tomás Mateo.

Se han desarrollado varias técnicas basadas en esta tecnología para el genotipado de *apoE* que incluyen el uso de sondas tipo TaqMan®. Por ejemplo, en el trabajo desarrollado por Zhong et al.⁴⁴ optimizan un ensayo que se basa en la metodología de qPCR alelo específica donde se incorpora una sonda para la monitorización de tipo TaqMan®. Diseñan y evalúan un conjunto de cebadores que dan lugar a amplificaciones específicas para la identificación de los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ respectivamente (Figura 4: Ejemplo de diagrama esquemático de método de genotipado de *apoE* por qPCR alelo-específica usando una sonda tipo TaqMan® y Figura 5: Ejemplo de representación de las curvas de amplificación para un ensayo alelo-específico de *apoE*).

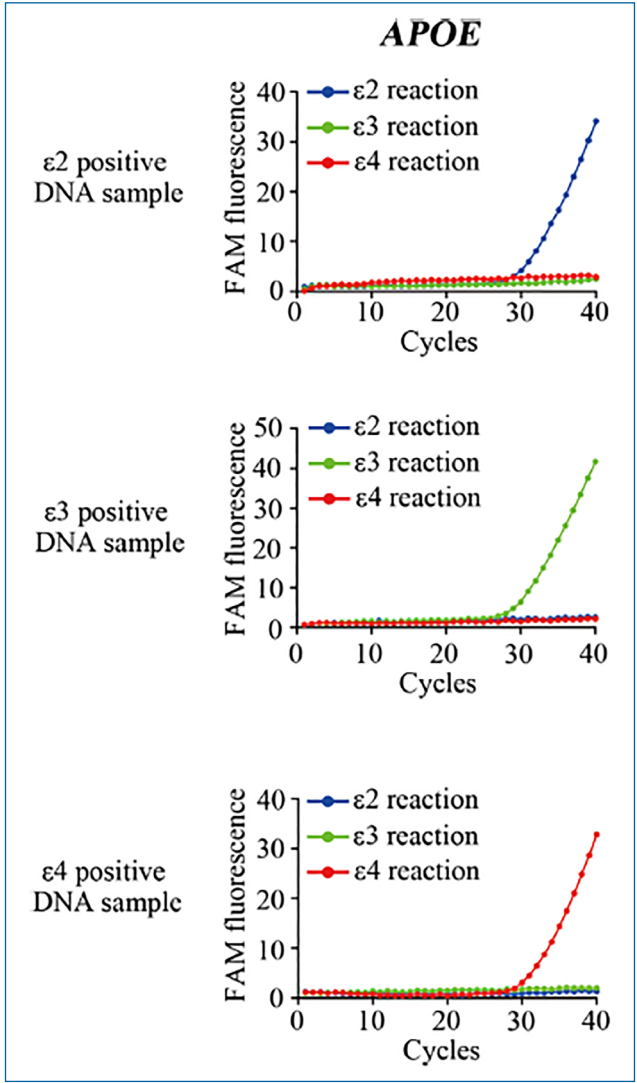
Figura 4. Ejemplo de diagrama esquemático de método de genotipado de *apoE* por qPCR alelo-específica usando una sonda tipo TaqMan®



Las amplificaciones de los diferentes alelos son llevadas a cabo usando cebadores alelo-específicos. Una única sonda de tipo TaqMan® fue incluida en la reacción para monitorizar los productos amplificados por qPCR. En este caso la sonda tiene un fluoróforo tipo FAM (sonda derivada de la fluoresceína) en el extremo final 5' de la secuencia de ADN y una molécula apantalladora (en inglés: quencher) tipo BHQ (black hole quencher) en su extremo final 3'. La sonda inicia su hibridación por su complementariedad con la secuencia.

Fuente: Zhong et al. 2016³³.

Figura 5. Ejemplo de representación de las curvas de amplificación para un ensayo aleloespecífico de apoE

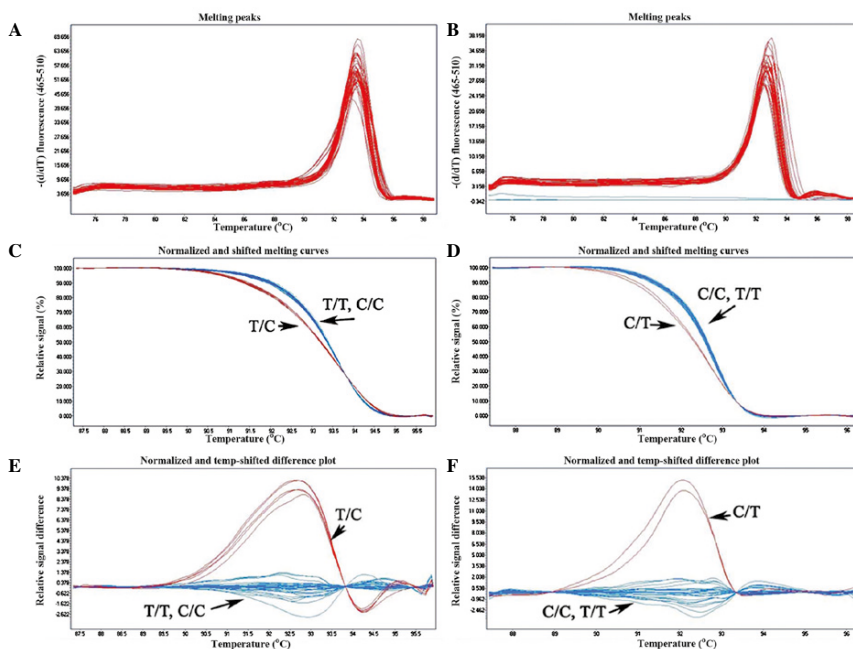


La especificidad y la eficiencia de cada uno de los ensayos aleloespecíficos diseñados para el genotipado de apoE, fue evaluada sintetizando un plásmido de ADN que contuviera la secuencia del alelo $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ó $\epsilon 4$ a amplificar. En este ejemplo se usaron 12.000 copias de cada uno de los 3 plásmidos de ADN usados como molde. En la imagen se representa el incremento de fluorescencia del fluoróforo FAM (eje Y), en función del número de ciclos de amplificación (eje X). Se observan reacciones específicas de amplificación para el alelo $\epsilon 2$ únicamente cuando el plásmido de DNA usados es positivo para $\epsilon 2$. Se obtuvieron resultados similares en la reacción $\epsilon 3$ ó $\epsilon 4$. Azul: reacción producida en presencia del alelo $\epsilon 2$. Verde: reacción producida en presencia del alelo $\epsilon 3$. Rojo: reacción producida en presencia del alelo $\epsilon 4$.

Fuente: Zhong et al. 2016³³.

Otras técnicas que se han desarrollado para el genotipado de *apoE* por qPCR incluyen el análisis de alta resolución por fusión (HRM, por sus siglas en inglés). En el trabajo desarrollado por Zhan et al. se ofrece una estrategia de identificación de los diferentes polimorfismos de *apoE* en la población. En la figura 6 (Figura 6: Análisis por HRM de los SNP rs429358 y rs7412), se muestra el algoritmo que fue usado en este trabajo de investigación⁴⁶. También, se han desarrollado otros protocolos haciendo uso de sondas mediante transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET, por sus siglas en inglés)⁴⁷.

Figura 6. Análisis por HRM de los SNP rs429358 y rs7412



A) Análisis de la T_m (temperatura de “melting”o de fusión del ADN) para el producto de amplificación correspondiente a rs429358. **B)** Análisis de la T_m para el producto de amplificación correspondiente a rs7412. Como se puede comprobar tanto en A como en B, sólo se encontró un único pico en cada una de las reacciones lo que indica que no se produjeron otros productos inespecíficos durante la reacción. **C)** Curvas de melting normalizadas y desplazadas para el producto de amplificación correspondiente a rs429358. **D)** Curvas de melting normalizadas y desplazadas para el producto de amplificación correspondiente a rs7412. **E y F)** Imagen de la diferencia entre los productos de amplificación correspondiente a rs429358 (E) y rs7412 (F). Como se puede comprobar los mutantes heterocigotos (T/C ó C/T según el SNP de estudio) resultan fácilmente distinguibles respecto a los no mutantes (T/T ó C/C según el SNP de estudio). En el caso de los mutantes homocigotos (C/C ó T/T según el SNP de estudio) la diferenciación resulta más imperceptible pero los autores lo solucionan adicionando ADN no mutante (alelo ε3/ε3) a la reacción para producir producto de ADN heterodúplex y de esta forma las curvas de melting de los mutantes homocigotos se pueden diferenciar de los no mutantes.

Fuente: Zhan et al. 2015³⁵.

Sin embargo, la técnica de genotipado de *apoE* por qPCR presenta algunas limitaciones, las principales están relacionadas con la formación de dímeros de cebadores (fenómeno conocido como “*primer dimer*”) lo que puede complicar la interpretación de las curvas de *melting* y el uso de las sondas fluorescentes, lo cual generalmente es altamente costoso⁴⁴. Con el objetivo de abaratar el procedimiento se han propuesto algunos protocolos donde se usan cebadores alelo-específico, pero con una sonda no específica de tipo SYBR™ Green para la monitorización de la reacción de qPCR⁴⁸.

Existen casas comerciales de productos diagnóstico que ofrecen pre mezclas de qPCR en formato líquido para llevar a cabo el genotipado de *apoE*. Este formato permite minimizar el número de pasos para llevar a cabo la reacción, lo que minimiza el riesgo de error, así como facilitar la realización de la técnica. Por ejemplo, hay casas comerciales que suministran una mezcla de qPCR que incluye todos los reactivos (Master mix, cebadores y sonda) que permiten la diferenciación de los 6 genotipos producto de los 2 SNP, incluye un control interno de funcionamiento de la reacción y además tienen disponible un software que interpreta automáticamente los resultados^{49,50}.

En el mercado también hay disponibles Master mix específicas para llevar a cabo el genotipado de los SNP (“*TaqMan™SNP Genotyping Assay, Life Technologies, USA*”). Este tipo de reactivos están optimizados para el genotipado, pero a diferenciar de las anteriores es necesario adicionar los cebadores y sonda previamente seleccionados por lo que se requiere un paso previo de optimización⁵¹.

Pese a la gran cantidad de facilidades que se ofertan hoy en día para la determinación del genotipo de *apoE* por qPCR, es importante tener en consideración la patología, y consecuentemente la mutación o conjunto de mutaciones relacionados para hacer la selección de los reactivos o técnicas más recomendables para su identificación. Por ejemplo, en el caso de DBLP a veces el desarrollo de la enfermedad está originado por mutaciones raras y que únicamente con la secuenciación del exón 4 o incluso del gen completo podrán ser detectadas^{4,52}.

Alcances y objetivos

En 2019, se publica en España el “*Plan integral de Alzheimer y otras demencias (2019-2023)*” que, entre otros objetivos, plantea el diseño de políticas de promoción de un envejecimiento activo y saludable⁴¹. Probablemente asociado a la identificación de la carencia en nuestro medio de medidas de prevención¹⁵. A esto habría que añadir, la asunción de que un diagnóstico temprano de EA ofrece un mayor margen de tiempo para planificar las necesidades de atención y apoyo antes de que los síntomas empeoren, y que las terapias farmacológicas y no farmacológicas se instauren antes, lo que puede prolongar el tiempo en el que la persona conserve una mejor calidad de vida²².

En España, el genotipado de *apoE* se encuentra entre los análisis genéticos disponibles en algunas Comunidades Autónomas (CCAA)⁵³. Sin embargo, su uso es ocasional y limitado, debido fundamentalmente a que se considera una prueba que carece de valor diagnóstico y que su utilidad reside exclusivamente como indicador de riesgo de EA²².

Con todo lo anterior, se da un contexto de incertidumbre en el que son numerosos los sistemas biológicos en los que el gen *apoE* participa y en el que es plausible que trastornos aparentemente dispares compartan mecanismos fisiopatológicos. En este escenario se propone una evaluación del papel de la caracterización del gen *apoE* por qPCR en la DBLP; así como el riesgo de desarrollar EA de inicio tardío en personas que presentan un estado de morbilidad o multimorbilidad (obesidad, síndrome metabólico y/o diabetes).

Objetivos específicos:

- 1) Identificar el papel del genotipado de *apoE* mediante qPCR en el diagnóstico de la DBLP.
- 2) Investigar la existencia de estudios que contemplen en el contexto del genotipado *apoE* y la EA de inicio tardío, la coexistencia de obesidad, síndrome metabólico y diabetes, así como los antecedentes de enfermedades infecciosas y/o de infertilidad en la persona.
- 3) Recopilar los modelos pronósticos empleados habitualmente en la práctica clínica que integren el genotipado de *apoE* por qPCR con el objetivo de establecer el riesgo de desarrollar EA de inicio tardío y relacionar los factores predictores empleados en cada uno de los modelos pronóstico.

- 4) Comparar los distintos modelos pronósticos para la EA de inicio tardío mediante la cuantificación de su rendimiento pronóstico.
- 5) Identificar personas con fenotipos y antecedentes personales que podrían beneficiarse de la estimación de su riesgo individual para desarrollar EA de inicio tardío y, por tanto, candidatas a la instauración de medidas preventivas y terapéuticas adecuadas.

Los siguientes aspectos no serán abordados en el informe:

- Aspectos relacionados con la fertilidad en humanos, fuera del contexto de las ECV y de la EA.
- La longevidad de las personas sin un contexto que la relacione con las ECV y la EA.
- Realización del genotipado para *apoE* en personas asintomáticas y sin antecedentes de interés, dado que se consideraría una práctica carente de ética.
- No se tendrán en cuenta evaluaciones económicas para el genotipado *apoE*. Tampoco se contará con la participación de los pacientes, aunque se prestara especial atención a los aspectos éticos en la utilización de la tecnología.

Este informe surge a petición de la Comisión de Prestaciones, Aseguramiento y Financiación (CPAF) en el proceso de identificación y priorización de necesidades de evaluación que se lleva a cabo para conformar el Plan de Trabajo Anual de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y prestaciones del SNS.

Las personas potenciales usuarias del informe, son las integrantes del CPAF para la valoración de la actualización de la cartera de servicios, gestores hospitalarios y de Atención Primaria, así como profesionales sanitarios que tienen que valorar, proponer y acordar con sus pacientes medidas preventivas de modificación de hábitos y terapéuticas para personas con elevado riesgo de sufrir eventos cardiovasculares o la EA.

Metodología

1. Pregunta de investigación

La pregunta de investigación planteada en este informe contempla varios aspectos referentes al genotipado de *apoE* por qPCR, de tal forma que, permite estructurar la información en dos apartados, de acuerdo a las condiciones de estudio. El primero sobre su utilidad en el diagnóstico de la DBLP y el segundo respecto a su integración dentro de modelos predictivos pronóstico para la EA de inicio tardío.

Se estructura la pregunta, siguiendo el formato PICO, en los siguientes términos:

Población:

Para DBLP:

Personas con signos y síntomas de dislipemia (alteraciones lipídicas, xantomas cutáneos, diabetes, síndrome metabólico, obesidad) y/o antecedentes cardiovasculares.

Para EA de inicio tardío:

Personas que presentan manifestaciones compatibles con la EA incipiente, mayores de 65 años de edad y personas que, sin manifestaciones incipientes compatibles con la EA, pudiesen presentar un fenotipo de sobrepeso u obesidad y tengan asociadas comorbilidades tales como un síndrome metabólico, diabetes y/o antecedentes de infertilidad y/o de infecciones.

Intervención:

Para DBLP:

Empleo de la qPCR para la caracterización del gen *apoE*.

Para EA de inicio tardío:

Modelo pronóstico con el empleo de la técnica de qPCR para la identificación de los dos alelos de los genes *apoE* y los factores predictores,

atendiendo a las características de pleiotropia que presenta la lipoproteína apoE.

Comparador:

Para DBLP:

Empleo de otras técnicas de caracterización del gen *apoE*, tanto genotípicas como fenotípicas.

Para EA de inicio tardío:

Otros modelos pronósticos que incluyan o no otras técnicas de genotipado.

Resultados:

Para DBLP:

Estimadores de pruebas diagnósticas (sensibilidad, especificidad, valores predictivos, cocientes de probabilidad), así como estimadores de asociación (Odds Ratio).

Para EA de inicio tardío:

Relación de los modelos pronóstico empleados con el uso del genotipado *apoE* y las covariables (antecedentes personales y comorbilidades) empleadas en los modelos pronósticos. Análisis del valor predictivo incremental entre modelos pronósticos. Estimadores de asociación que relacionen EA de inicio tardío con el fenotipo de la persona y/o con sus antecedentes clínicos.

Diseño de estudios:

Para DBLP:

Revisiones sistemáticas de pruebas diagnósticas, ensayos clínicos, estudios observacionales y transversales.

Para EA de inicio tardío:

Revisiones sistemáticas de ensayos clínicos y de estudios observacionales. Ensayos clínicos y estudios observacionales. Estudios de modelos pronósticos y revisiones sistemáticas de modelos pronósticos.

2. Búsqueda bibliográfica

Se realizó una revisión sistemática de la evidencia científica consultando las siguientes fuentes de información: Medline, Embase, The Cochrane Library, Web of Science, International HTA Databas y TESEO. Además, se realizó una búsqueda de ensayos clínicos en curso: ClinicalTrial.gov, Current Controlled Trial (ISRCTN registry), International Clinical Trials Registry Platform (WHO) y EU Clinical Trials Register.

Se diseñó una estrategia de búsqueda bibliográfica para cada fuente de información consultada utilizando términos de lenguaje libre y descriptores adaptados a cada una de las bases de datos consultadas. Se describen las estrategias de búsqueda bibliográfica y las fuentes de información consultadas en el anexo 3 (Anexo 3: Estrategia de búsqueda bibliográfica). Los resultados de la búsqueda fueron incluidos en el gestor bibliográfico End-Note 20.4.1 (Bld 16297).

No se estableció un periodo de búsqueda determinado con el fin de recuperar el máximo número de trabajos de investigación posibles y se crearon alertas bibliográficas, hasta que se produzca el cierre de la edición del informe con el objetivo de identificar los estudios relacionados con el motivo de este informe y que puedan ser publicados en este periodo de tiempo.

3. Criterios de selección de estudios

Los resultados de las búsquedas fueron revisados por pares, inicialmente mediante la lectura de título y resumen. Los estudios solicitados a texto completo fueron revisados por pares y, en caso de cumplir con los criterios de inclusión, fueron seleccionados como fuente de evidencia. En caso de discordancia entre los dos revisores, se trató de encontrar un consenso y en los casos en los que no fue posible, se contó con un tercer revisor cuyo posicionamiento fue el adoptado.

En los anexos 4 y 5 se muestran los diagramas de flujo que describen los procesos de identificación y selección de los estudios para la DBLP y la EA de inicio tardío, respectivamente. Todos los estudios revisados a texto completo y excluidos se presentan en los anexos 6 y 7 con su principal motivo de exclusión.

Los criterios de selección de los estudios fueron:

Criterios de inclusión:

Para DBLP:

- *Población:*

Personas con alteraciones lipídicas y signos y síntomas susceptibles de estar vinculados a DBLP.

- *Intervención:*

Estudios para la caracterización del gen *apoE* mediante qPCR.

- *Comparador:*

Estudios que empleen técnicas de caracterización del gen *apoE* diferentes a la qPCR.

- *Resultados:*

Características de pruebas diagnósticas.

Para EA de inicio tardío:

- *Población:*

Personas con manifestaciones compatibles con EA incipiente mayores de 65 años de edad. Personas que, sin manifestaciones incipientes compatibles con la EA, presentan un fenotipo de sobrepeso u obesidad y tienen asociadas comorbilidades tales como un síndrome metabólico, diabetes y/o antecedentes de infertilidad y/o de infecciones.

- *Intervención:*

Estudios que con los resultados del genotipado del gen *apoE* mediante qPCR, los incluyan en modelos pronóstico para su uso en clínica. Los estudios predictivos pronósticos que incluyan resultados del genotipado del gen *apoE* mediante técnicas genéticas (diferentes a qPCR) serán recopilados en una tabla que recoja sus principales características.

- *Comparador:*

Estudios que aporten otros modelos pronóstico con o sin otras técnicas de genotipado.

- *Resultados:*

Tipos de modelos pronóstico empleados con el uso del genotipado *apoE*. Valor predictivo incremental. Relación de fenotipos, antecedentes personales y combinaciones.

Para ambas situaciones clínicas:

- *Diseño*

Revisiones sistemáticas de ensayos clínicos y de estudios observacionales. Ensayos clínicos y estudios observacionales. Estudios transversales. Estudios de modelos pronósticos. Revisiones sistemáticas de modelos pronósticos. Siempre que cuenten con la desagregación de datos necesaria para cada tipo de entidad nosológica evaluada.

Criterios de exclusión:

- *Población:*

Personas asintomáticas y sin ningún tipo de comorbilidad o antecedentes personales sospechosos de tener relación con alteraciones cardiovasculares y/o EA (obesidad, síndrome metabólico, diabetes, antecedentes de infertilidad, infecciones de repetición).

- *Intervención:*

Caracterización del gen *apoE* con técnicas de fenotipado.

- *Comparador:*

Uso de modelos pronóstico con técnicas de fenotipado (no se excluyen las técnicas de fenotipado con objetivo diagnóstico para DBLP).

- *Resultados:*

Estimadores de pruebas diagnósticas para el EA de inicio tardía.

- *Diseño de estudios:*

Comunicaciones a congresos, editoriales, publicaciones sin resumen, revisiones no sistemáticas.

4. Extracción de datos

En la extracción de datos se incluyó entre las variables recogidas de cada estudio, información general como apellido del primer autor, año de publicación, ámbito de realización, objetivos del estudio, características de los pacientes, así como de la intervención, el comparador y variables de resultado o desenlaces considerados.

De cada estudio seleccionado, se extrajo información sobre las características de los pacientes, comorbilidad asociada, sus antecedentes clínicos

personales, estimadores de prueba diagnóstica (para DBLP) y componentes del modelo pronóstico (para EA de inicio tardío) y estimadores obtenidos de calibración, discriminación y reclasificación. Se recopiló información sobre el diseño y metodología empleada en el estudio, espacio temporal en que se desarrolló y el emplazamiento geográfico.

También se recopiló, en el formulario de extracción de datos, la técnica diagnóstica de caracterización del gen *apoE* para la comparación, modificaciones al modelo pronóstico en los que se emplea genotipado de *apoE* mediante qPCR, componentes del modelo pronóstico estándar de comparación, seguimiento de pacientes (si aplica), pérdidas de pacientes durante el seguimiento (si aplica) y la calidad del estudio.

Entre las medidas de resultados que se recopilaron, se encuentran los estimadores de pruebas diagnósticas, modelos pronóstico empleados con el uso del genotipado *apoE*, covariables empleadas en los modelos pronóstico, análisis del valor predictivo incremental entre modelos pronósticos, relación de fenotipos de personas y estimadores de asociación con EA de inicio tardío, antecedentes personales y comorbilidades.

5. Evaluación de la calidad de los estudios

Las revisiones sistemáticas de ensayos clínicos controlados y aleatorizados fueron evaluadas con la herramienta ROBIS⁵⁴, las de modelos pronóstico con CHARMS⁵⁵, los estudios de modelos pronóstico con PROBAST⁵⁶, y, el resto de diseños de estudios, con las herramienta de lectura crítica (FLC 3.0) de OSTEBA⁵⁷.

Para el análisis de los desenlaces, se utilizará el sistema GRADE (“*Grading of Recommendations, Assessment and Evaluation*”) para clasificar la evidencia aportada en alta, moderada, baja o muy baja, de cada uno de ellos y globalmente⁵⁸.

Dadas las características de este informe sobre diagnóstico y modelos pronóstico y la no participación de pacientes, no se ve necesaria la determinación de la importancia relativa de los desenlaces. En caso de reunir un gran número de desenlaces para el resto de apartados se desarrollará el proceso para establecer la importancia relativa de los mismos siguiendo la metodología GRADE⁵⁹.

Resultados

Se muestran los resultados desagregados por entidad nosológica analizada y con el eje común del genotipado de *apoE* por qPCR.

1. Papel del genotipado de *apoE* por qPCR en el diagnóstico de la DBLP

Se identificaron un total de 284 referencias bibliográficas a través de las estrategias de búsqueda de literatura científica, de las cuales 17 correspondían a registros de ensayos clínicos. Por título y resumen fueron descartadas 235 referencias. Se solicitaron 32 referencias a texto completo. En el proceso de lectura, se identificó por búsqueda inversa y solicitó un estudio más. Tras la lectura a texto completo se excluyeron un total 31 trabajos, siendo el principal motivo de exclusión, pese a incluir la determinación del gen *apoE* en el estudio de la DBLP, el objetivo del estudio, el cual era diferente al del presente informe o al uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado de *apoE*. (ver anexo 4: Diagrama de flujo. Genotipado de *apoE* por qPCR en el diagnóstico de la DBLP), incluyéndose en el análisis de eficacia un sólo estudio¹ que cumplía con los criterios de inclusión.

No se han identificado estudios que permitan analizar el papel del genotipado *apoE* mediante qPCR en el diagnóstico de la DBLP. El estudio incluido de Bea et al.¹ se centra en la selección inicial de pacientes mediante la definición del estado de hiperlipidemia y posterior diagnóstico mediante el uso de biomarcadores. No en el rendimiento diagnóstico de la qPCR.

El estudio de Bea et al.¹, cuyas principales características se resumen en el anexo 8 (ver anexo 8: Síntesis de la evidencia: Papel del genotipado de *apoE* en el diagnóstico de la DBLP), es un estudio observacional retrospectivo. Su objetivo es definir las características de la DBLP mediante el análisis genético de *apoE*; así como proponer un algoritmo diagnóstico para estudios de detección a gran escala poblacional de la DBLP, de acuerdo a una nueva definición de hiperlipidemia y unos umbrales a partir de los cocientes de varios biomarcadores descritos a continuación. La sugerencia por parte de los autores es que, este protocolo diagnóstico pueda ser usado en todas aquellas personas que presenten

perfiles lipídicos alterados, incluyendo también a aquellas que están siendo tratados con fármacos hipolipemiantes.

El estudio de Bea et al., realizado en España, comprende la recolección de muestras sanguíneas para la obtención del perfil lipídico y el genotipado de *apoE* desde enero de 2006 a abril de 2021 de personas procedentes de 3 cohortes: Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS, n=3.925), conjunto de la población general en edad laboral (AWHS: Estudio de Salud Laboral de Aragón, n=5.331) y pacientes de Unidades Externas lipídicas localizadas en 4 hospitales nacionales (Hospital Clínico de Barcelona, Hospital Sant Joan de Reus, Hospital Virgen de la Macarena de Sevilla y Hospital de Bellvitge, Barcelona; n=390). Las determinaciones bioquímicas del perfil lipídico a partir de muestra sanguínea procedentes de las cohortes HUMS y AWHS se procesaron usando los mismos protocolos normalizados de trabajo. En el caso de la cohorte HUMS el análisis genético del gen *apoE* se llevó a cabo mediante la secuenciación del exón 4 de este gen. En la cohorte AWHS el genotipo de *apoE* fue determinado mediante la tecnología qPCR usando un ensayo específico de genotipado de SNP tipo TaqMan® de la casa comercial Applied Biosystem⁵¹.

A partir de las cohortes de HUMS y AWHS se seleccionaron aquellas personas hiperlipidémicas (de acuerdo al criterio establecido en el estudio: TG \geq 150 mg/dL o LDLc (colesterol de tipo LDL) \geq 160 mg/dL o noHDLc (colesterol noHDL) \geq 190 mg/dL), sin tratamiento con fármacos hipolipemiantes y, de los cuales, se dispusiera de información acerca del genotipado de *apoE* (HUMS, n=2656; y AWHS, n=2004) con el objetivo de desarrollar un modelo diagnóstico. La validación del modelo se realiza con la muestra de pacientes de Unidades Externas lipídicas que cumplieron las mismas características (n=294). Aunque todos los sujetos evaluados cumplían con el criterio de hiperlipidemia establecido en el estudio, se identificaron entre las cohortes HUMS y AWHS, algunas diferencias estadísticamente significativas (proporción de varones, de diabéticos, edad, índice de masa corporal (IMC), niveles plasmáticos de glucosa, hemoglobina glicosilada, CT, TG y otras determinaciones lipídicas). Por ejemplo, la cohorte del HUMS presentó niveles medios de TG de 159 mg/dL (IC95%: 99 a 260), frente a los 118 mg/dL (IC95%: 82 a 175) de la cohorte AWHS (p<0,001).

Bea et al. y, dado que la mayoría de las personas con DBLP son homocigotas para el alelo $\epsilon 2$ de *apoE*, proponen la solicitud de un genotipado *apoE* confirmatorio $\epsilon 2/\epsilon 2$, en personas que cumplan las siguientes condiciones de hiperlipidemia: TG \geq 150 mg/dL ó LDLc \geq 160 mg/dL ó noHDLc \geq 190 mg/dL y que presenten los siguientes cocientes: noHDLc/apoB \geq 1,7 y TG/

apoB $\geq 1,35$ (nonHDLc [mmol/L]/apoB [g/L] $\geq 4,4$ and TG [mmol/L]/apoB [g/L] $\geq 3,5$) e independientemente de si están tomando o no medicación hipolipemiente.

Este modelo lo desarrollan con las personas que, provenientes de las 3 cohortes citadas, son hiperlipidémicos, no reciben tratamiento hipolipemiente y cuentan con un genotipado de *apoE*. Los valores que obtiene del rendimiento diagnóstico en términos de sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica son los siguientes: 100% (IC95%: 94,4 a 100), 87,2% (IC 95%: 86,2 a 88,1) y 87,3% (IC95%: 86,4 a 88,2), respectivamente.

Con esta información, los investigadores analizan el rendimiento diagnóstico de otros modelos que emplean sus propios criterios de hiperlipidemia y cocientes diagnósticos. Posteriormente, a los pacientes hiperlipidémicos seleccionados, se les aplicaron los nuevos umbrales diagnósticos propuestos (cocientes tomados como estándar de referencia) descritos previamente: noHDLc/apoB $\geq 1,7$ y TG/apoB $\geq 1,35$. (Ver tabla 2: Comparación del rendimiento diagnóstico de otros algoritmos con el modelo propuesto para la DBLP en pacientes hiperlipidémicos). Se observó que la exactitud diagnóstica varió entre el 37,9% (IC95%; 35,7 a 40,2) en el caso del algoritmo de Paquette et al.³; y el 95,5% (IC95%; 94,7 a 96,3) en el caso del criterio propuesto por Sampson et al.⁵ con un umbral diagnóstico VLDLc/TG $\geq 0,30$. Dado que cada modelo utilizó una definición específica, el número de personas varió en cada comparación con el modelo propuesto por Bea et al.¹

Tabla 2. Comparación del rendimiento diagnóstico de otros algoritmos con el modelo propuesto para la DBLP en pacientes hiperlipidémicos

| ESTUDIO | N | VP | VN | FP | FN | S (%) (IC95%)* | E (%) (IC95%)* | EXACTITUD DIAGNÓSTICA (%) (IC95%)* |
|---------------------------------|------|----|------|-------|----|--------------------|--------------------|------------------------------------|
| Sniderman et al. ² | 1183 | 41 | 898 | 237 | 7 | 85,4 (72,2 a 93,9) | 79,1 (76,6 a 81,5) | 79,4 (77,0 a 81,7) |
| Paquette et al. ³ | 1858 | 49 | 656 | 1.153 | 0 | 100 (92,8 a 100) | 36,3 (34,0 a 38,5) | 37,9 (35,7 a 40,2) |
| Boot et al. ⁴ | 1889 | 47 | 1612 | 227 | 3 | 94,0 (83,5 a 98,8) | 87,7 (86,1 a 89,1) | 87,8 (86,3 a 89,3) |
| Sampson et al. ⁵ (a) | 2872 | 15 | 2729 | 86 | 42 | 26,3 (15,5 a 39,7) | 96,9 (96,2 a 97,6) | 95,5 (94,7 a 96,3) |
| Sampson et al. ⁵ (b) | 2872 | 36 | 2592 | 223 | 21 | 63,2 (49,3 a 75,6) | 92,1 (91,0 a 93,1) | 91,4 (90,3 a 92,4) |

Modelo propuesto¹: *Criterio diagnóstico:* noHDLc/apoB $\geq 1,7$ y TG/apoB $\geq 1,35$.

Sniderman et al.: Hiperlipidemia: apoB <120 mg/dL y TG >133 mg/dL. Criterio diagnóstico: CT/apoB >2,4 y TG/apoB <8,8

Paquette et al.: Hiperlipidemia: CT >200 mg/dL y TG >175 mg/dL. Criterio diagnóstico: noHDLc/apoB > 1,43

Boot et al.: Hiperlipidemia: CT >193 mg/dL y TG >177 mg/dL. Criterio diagnóstico: noHDLc/apoB > 1,95

Sampson et al. (a): Hiperlipidemia: TG entre 150 y 1000 mg/dL. Criterio diagnóstico: VLDL-colesterol/TG $\geq 0,30$

Sampson et al. (b): Hiperlipidemia: TG entre 150 y 1000 mg/dL. Criterio diagnóstico: VLDL-colesterol/TG $\geq 0,25$

Cálculo de los valores de la especificidad, sensibilidad y exactitud diagnóstica para cada uno de los algoritmos diagnóstico comparados usando los criterios de dislipemia y criterios diagnósticos de cada estudio y tomando como estándar de referencia el criterio diagnóstico propuesto por Bea et al. (*Criterio diagnóstico:* no-HDLc/apoB $\geq 1,7$ y TG/apoB $\geq 1,35$).

apoB: apolipoproteína B. **CT:** colesterol total. **E:** especificidad. **FN:** falsos negativos. **FP:** falsos positivos. **IC95%:** intervalo de confianza al 95%. **N:** tamaño muestral. **noHDLc:** colesterol noHDL "non-high density lipoprotein colesterol". **S:** sensibilidad. **TG:** triglicéridos. **VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad. **VN:** verdaderos negativos. **VP:** verdaderos positivos.

* El estudio original muestra los valores absolutos para cada estudio y la sensibilidad y especificidad. Para el cálculo de la exactitud diagnóstica junto con sus IC95%, así como los de la sensibilidad y especificidad, se empleó la herramienta MedCalc⁶⁰.

Fuente: Bea et al. 2023¹.

En un segundo análisis, los investigadores estudiaron a todos los pacientes con la definición de hiperlipidemia ($TG \geq 150$ mg/dL ó $LDLc \geq 160$ mg/dL ó $noHDLc \geq 190$ mg/dL) propuesta por ellos mismos y aplicaron los criterios diagnósticos de cada estudio, tomando como estándar de referencia los umbrales de los cocientes diagnósticos propuestos ($noHDLc/apoB \geq 1,7$ y $TG/apoB \geq 1,35$). Con esta nueva definición de hiperlipidemia y umbrales diagnósticos, se observaron valores de sensibilidad, especificidad y exactitud diagnóstica más altos que los obtenidos con los criterios de dislipemias y umbrales diagnósticos propuestos por Sniderman et al.², Boot et al.⁴ y Sampson et al.⁵ y misma sensibilidad tras emplear los parámetros descritos por Paquette et al.³, pero con una especificidad más elevada (Ver tabla 3. Evaluación comparativa de los diferentes algoritmos diagnóstico de DBLP en personas hiperlipidémicas según criterios de Bea et al.). Con el uso del algoritmo propuesto por Bea et al.¹ se emplea unos criterios de hiperlipidemia y umbrales de cocientes diagnósticos menos estrictos, lo que genera un número mayor de personas susceptibles de ser diagnosticadas de DBLP.

Tabla 3. Evaluación comparativa de los diferentes algoritmos diagnóstico de DBLP en personas hiperlipidémicas según criterios de Bea et al.

| ESTUDIO | N | VP | VN | FP | FN | S (%) (IC95%) | E (%) (IC95%) | EXACTITUD DIAGNÓSTICA (%) (IC95%) |
|--|-------|----|-------|-------|----|--------------------|--------------------|-----------------------------------|
| Modelo propuesto ¹ | 4.954 | 64 | 4262 | 628 | 0 | 100 (94,4 a 100) | 87,2 (86,2 a 88,1) | 87,3 (86,4 a 88,2) |
| Sniderman et al. ² | | 52 | 4.093 | 797 | 12 | 81,3 (69,5-89,9) | 83,7 (82,6 a 84,7) | 83,7 (82,6 a 84,7) |
| Paquette et al. ³ | | 64 | 1.691 | 3.199 | 0 | 100 (94,4-100) | 34,6 (33,3 a 35,9) | 35,4 (34,1 a 36,8) |
| Boot et al. ⁴ | | 55 | 4.099 | 791 | 9 | 85,9 (75,0 a 93,4) | 83,8 (82,8 a 84,9) | 83,9 (82,8 a 84,9) |
| Sampson et al. ⁵ | | 18 | 4.149 | 741 | 46 | 28,1 (17,6 a 40,8) | 84,9 (83,8 a 85,8) | 84,1 (83,1 a 85,1) |
| <p>Modelo propuesto: <i>Hiperlipidemia:</i> TG \geq150 mg/dL ó LDLc \geq160 mg/dL ó noHDLc \geq190 mg/dL. <i>Criterio diagnóstico:</i> no-HDLc/apoB \geq1,7 y TG/apoB \geq1,35</p> <p>Sniderman et al.: Criterio diagnóstico: CT/apoB $>$2,4 y TG/apoB$<$8,8</p> <p>Paquette et al.: Criterio diagnóstico: noHDLc/apoB $>$ 1,43</p> <p>Boot et al.: Criterio diagnóstico: noHDLc/apoB $>$ 1,95</p> <p>Sampson et al.: Criterio diagnóstico: VLDL-colesterol/TG \geq0,30</p> <p>apoB: apolipoproteína B. CT: colesterol total. E: especificidad. FN: falsos negativos. FP: falsos positivos. IC95%: intervalo de confianza al 95%. N: tamaño muestral. noHDLc: colesterol noHDL "non-high density lipoprotein cholesterol". S: sensibilidad. TG: triglicéridos. VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad. VN: verdaderos negativos. VP: verdaderos positivos.</p> <p>* Para el cálculo del intervalo de confianza (IC) y los valores de la sensibilidad y especificidad a partir de los datos facilitados en el trabajo, se hizo uso de la herramienta bioinformática MedCalc®⁶⁰.</p> <p><i>Fuente:</i> Bea et al. 2023¹.</p> | | | | | | | | |

El estudio de Bea et al.¹ presenta una calidad metodológica baja debido a las limitaciones identificadas, entre ellas, la ausencia de un estudio comparativo directo entre las diferentes técnicas de caracterización del gen *apoE*. Aunque se realizan análisis de fiabilidad con unos estándares de referencia, los parámetros lipídicos y/o umbrales diagnósticos para la selección y diagnóstico de DBLP son los propuestos por los propios investigadores. No se ofrece una comparación de los estimadores de fiabilidad diagnóstica con un estándar de referencia adecuado para la DBLP como la ultracentrifugación o por técnicas inmunológicas como ELISA o métodos turbidimétricos. Sólo en la cohorte derivada del HUMS se llevó a cabo una secuenciación del exón 4, no especificándose si se ha encontrado en el proceso de investigación algún paciente que muestre perfiles compatibles con DBLP en ausencia de genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$. Otra de las limitaciones viene dada por la población a estudio. Tanto las personas registradas en la cohorte del HUMS, las del AWHS, como las de las Unidades Externas lipídicas, no constituyen por sí solas ni agrupadas, grupos representativo de la población general.

2. Identificación y comparación de estudios predictivos pronósticos para la estimación del riesgo de padecer EA de inicio tardío que integren el genotipado de *apoE* por qPCR

Se llevaron a cabo dos estrategias de búsquedas bibliográficas cuyos términos quedan recogidos en el anexo 3 (ver anexo 3: Estrategia de búsqueda bibliográfica) y resultados cuantitativos en el anexo 5 (ver anexo 5. Diagrama de flujo. Genotipado de *apoE* por qPCR en modelos predictivos pronóstico de EA de inicio tardío), con el objetivo de ampliar la búsqueda de evidencia científica. Fusionadas las búsquedas y, eliminados los duplicados, se identificaron un total de 818 referencias bibliográficas. Por título y resumen fueron descartadas 735. Se solicitaron 83 referencias a texto completo. Tras su lectura se excluyeron todos los trabajos ya que no se identificó ninguno en el que se especificara el uso de la qPCR como técnica de genotipado incluida en un modelo predictivo pronóstico para la estimación de padecer EA de inicio tardío, siendo el principal motivo de exclusión que, la mayoría de los estudios, hacían uso de la integración del genotipado de *apoE* dentro de un modelo predictivo diagnóstico de EA.

No se han recuperado estudios que, en el contexto del genotipado apoE permitieran establecer algún tipo de asociación entre la EA de inicio tardío y la coexistencia de obesidad, síndrome metabólico y diabetes, así como los antecedentes de enfermedades infecciosas y/o de infertilidad en la persona.

Atendiendo a uno de los objetivos del informe, se recopilaron el conjunto de modelos predictivos pronósticos para establecer el riesgo de EA de inicio tardío y que incluyeran el uso de técnicas genéticas para el análisis de *apoE*; aún sin especificar el método empleado. En el anexo 9 (Anexo 9: Modelos predictivos pronóstico para establecer riesgo de aparición de EA de inicio tardío que incluyen genotipado *apoE*) se muestran las características principales del total de los 8 los modelos predictivos recuperados. Todos ellos son estudios retrospectivos con un periodo de seguimiento comprendido entre los 2 y 8 años y un volumen de participantes que oscila desde 81 a más de 10.000.

Únicamente en el trabajo realizado por Abdullah et al.⁶, se indica la técnica usada (ARMS) para el genotipado de *apoE*. En los trabajos llevados a cabo por Sorensen et al.¹¹, Qiu et al.⁹, Davatzikos et al.⁷, Kauppi et al.¹³, y Van Maurik et al.¹²; se especifica que los participantes proceden de la base de datos *Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative* (ADNI por sus siglas en inglés) mientras que en el caso del estudio de Hartz et al.⁸ son originarios del registro *National Alzheimer's Coordinating Center* (NACC por sus siglas en inglés). Ambas presentan datos de personas norteamericanas, son de libre acceso público y permiten a los investigadores, previa autorización, acceder a imágenes, datos clínicos, genómicos y biomarcadores con objetivos docentes, de investigación científica o planificación de estudios clínicos. Tal y como se menciona en la publicación proporcionada por el ADNI acerca de la metodología empleada, el genotipado de las muestras para los diferentes marcadores SNP y variaciones en el número de copias (VNC) potencialmente relacionados con EA fueron analizados mediante la tecnología de microarrays "*Human610-Quad BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA)*". Sin embargo, el genotipado de *apoE* para los dos SNP de interés (rs429358 y rs7412) al no estar incluido en este chip, fue llevado a cabo mediante PCR-RFLP⁶¹. En el caso del trabajo conducido por Hartz et al.⁸ se especifica que, los participantes de la NACC fueron genotipados de acuerdo a la metodología empleada en Talbot et al. 1994. Sin embargo, al consultar la fuente original no se especifica el método usado⁶².

En referencia a los factores predictores que, junto con *apoE* se usaron más repetidamente; se incluyen parámetros como la edad, sexo, función cognitiva evaluada a través del Test Mini-Mental (MMSE por sus siglas en

inglés) junto con diferentes parámetros de imagen como el análisis de regresión tipo Cox de las regiones de interés (COX-ROI por sus siglas en inglés), el análisis de covarianza de regiones de interés (ANCOVA-ROI por sus siglas en inglés) o la IRM y biomarcadores en sangre como $A\beta_{1-42}$ ó p-tau. Tal y como se muestra en el anexo 9, sólo en cuatro de ellos^{8,9,11,12} se proponían algunos datos acerca de los umbrales de los factores predictores a integrar en el modelo. Métodos de validación interna se aplicaron a los estudios de Qiu et al.⁹ y Shigemizu et al.¹⁰, mientras que la validación externa únicamente se llevó a cabo en el estudio de Van Maurik et al.¹².

Dada la ausencia de información completa en los estudios que presentan modelos pronóstico, no ha sido posible realizar una comparación entre los mismos. Por el mismo motivo, tampoco se ha considerado necesario hacer una evaluación individualizada mediante la herramienta PRO-BAST⁵⁶.

Tampoco ha sido posible caracterizar a personas con sus fenotipos y antecedentes personales que podrían beneficiarse de una estimación del riesgo individual para desarrollar EA de inicio tardío y, por tanto, candidatas a la instauración de medidas preventivas y terapéuticas adecuadas.

3. Aspectos éticos y legales

No se realizó una revisión sistemática para la incorporación de aspectos éticos y legales en el informe. Sí se han revisado los listados de comprobación de los dominos de análisis ético y legal recogidos en el informe de Gutiérrez-Ibarluzea et al. 2018⁶³ tanto para el uso del genotipado *apoE* mediante qPCR en el diagnóstico de la DBLP como en el pronóstico para la EA de inicio tardío. Para la incorporación de elementos éticos y legales a la EA de inicio tardío, también se ha tenido en cuenta el trabajo de Wells et al. 2022 que, siendo un trabajo centrado en tecnologías emergentes y no exclusivamente en la qPCR, el enfoque que realizan contiene aspectos éticos²² por lo que se ha considerado de utilidad para los objetivos del presente informe.

3.1. Genotipado de apoE por qPCR en el diagnóstico de la DBLP⁶³

Sin estudios que permitan analizar el papel del genotipado *apoE* mediante qPCR en el diagnóstico de la DBLP, no ha sido posible evaluar el uso de la qPCR frente a otras técnicas para el genotipado de *apoE*.

Dentro de los aspectos éticos generales, se ha considerado que el uso de esta tecnología no influiría en convicciones morales, culturales o religiosas, ni en valores, implicaciones sociales o en la modificación de las percepciones sobre determinadas personas con la DBLP.

Existe la posibilidad de que pudieran darse consecuencias no deseadas con el uso de esta tecnología, para personas con DBLP, como puede ser la aparición de barreras para la contratación de pólizas de seguros sanitarios privados, seguros de vida o de otra índole o, un incremento considerable de las primas al contratar un seguro de estos.

El potencial uso de esta tecnología no parece que pudiera influir en ninguno de los aspectos de autonomía de la persona. Tampoco se han visto indicios de que pudiera afectar a la dignidad e integridad humana.

No se ha podido poner de relieve, ante la ausencia de estudios, los potenciales beneficios de esta tecnología. Con el análisis del estudio de Bea et al.¹, no parece que esta tecnología pueda ofrecer mayores beneficios al paciente, aparte de las ventajas y limitaciones que puede ofrecer su realización en el laboratorio. Tampoco parece que la tecnología pueda generar mayores riesgos que las técnicas en uso actual, más allá del uso de dicha información con consecuencias no deseadas y como se han descrito previamente.

Su uso no afectaría a los derechos humanos básicos de la persona y los aspectos legales como el derecho de la persona a la información o a no ser informada, están cubiertas en nuestro contexto sanitario⁶⁴.

3.2. Incorporación del genotipado de *apoE* por qPCR a modelos pronóstico para la EA de inicio tardío

No ha sido posible analizar el papel del genotipado *apoE* mediante qPCR en el pronóstico de la EA frente a otros modelos pronóstico.

Dentro de los aspectos éticos generales, se ha considerado que el uso de esta tecnología no influiría en convicciones morales, culturales o religiosas. Sí podría influir en valores, implicaciones sociales o en la modificación de las percepciones sobre determinadas personas con el diagnóstico de EA.

Existe la posibilidad de que pudieran darse consecuencias no deseadas con el uso de esta tecnología, para personas con EA, entre ellas, la imposibilidad de contratar determinados seguros de asistencia sanitaria privada u otros o tener que asumir un incremento de las primas de mucha mayor cuantía.

Su uso, no parece que pudiera influir en ninguno de los aspectos de autonomía de la persona. Tampoco se han visto indicios de que pudiera afectar a la dignidad e integridad humana.

No se ha podido poner de relieve, ante la ausencia de estudios, los potenciales beneficios de esta tecnología. Ni siquiera los estudios seleccionados que pretenden ofrecer modelos pronóstico, ofrecen la información suficiente para poder aplicarlo en la clínica asistencial o carecen de las medidas de validación adecuadas⁶⁻¹³. Tampoco parece que la tecnología pueda generar mayores riesgos que las técnicas en uso actual, más allá del uso de dicha información con consecuencias no deseadas. Ahora bien, tal como se expresa más adelante, se debería tener en cuenta el momento en que se realizan las determinaciones y las consecuencias de los resultados para la persona y familiares.

Tampoco parece que pudieran verse afectados los derechos humanos básicos de la persona y los aspectos legales, dado que el derecho de la persona a la información o a no ser informada, están cubiertas en nuestro contexto sanitario⁶⁴.

En el caso específico de las demencias, existe preocupación acerca de las consecuencias éticas y no deseadas, en caso de contar con un mayor volumen de personas en etapas incipientes de DCL y preclínicas de EA. Esto puede acarrear una mayor probabilidad de FP, lo que conlleva una preocupación innecesaria en las personas y su entorno familiar, niveles de ansiedad por un diagnóstico en el que los tratamientos no impiden la evolución de la enfermedad y, puede suponer un aumento de los problemas psicosociales²². Además, en nuestro contexto, podría ser una barrera para quien quiera contratar una póliza de seguro o verse en la necesidad de afrontar primas más cuantiosas.

No se recomienda realizar pruebas de detección a personas que no muestran síntomas de EA y, debe tenerse en cuenta que, pueden existir diferencias para el momento más adecuado del diagnóstico de EA de una persona, en comparación con el momento adecuado para la “sociedad” o su entorno social inmediato. Para la persona afectada, el momento apropiado probablemente sea individualizado (por ejemplo, estar en la fase DCL), mientras que el momento apropiado para la sociedad podría ser mucho más temprano, con el objetivo de adoptar, por ejemplo, medidas preventivas. Un dilema ético es decidir qué momento priorizar. La realización de pruebas, con la consiguiente revelación de anomalías genéticas que aumentan el riesgo de padecer EA de una persona, pueden no ser efectivas, dado que el riesgo genético es un concepto difícil de entender para muchas personas²² aunque, por otra parte, las personas tienen derecho a saber y a tomar

decisiones autónomas sobre su salud, así como a que se respete su voluntad de no ser informadas⁶⁴.

Se considera probable que, la presentación de la EA sea más heterogénea de lo que se pensó inicialmente, por lo que puede no ser ético agrupar todos los diagnósticos de EA en un único tipo de enfermedad con un único método de diagnóstico. También existe un dilema ético al considerar los tratamientos disponibles para la EA. Actualmente, no existe una forma efectiva de prevenir la progresión de la EA o de revertir el daño producido, por lo que es importante que quienes se someten a pruebas, den su consentimiento informado y tengan la autonomía para elegir si hacerse la prueba o no. Muchas personas temen el lenguaje estigmatizante y la asociación negativa con la “demencia”, y los profesionales sanitarios han mencionado la posibilidad de que las personas se sientan devastadas por un diagnóstico definitivo. Un diagnóstico más temprano puede generar más años de preocupación²² y, es posible, es respetable y la legislación vigente les protege, que algunas personas no quieran conocer su diagnóstico hasta más tarde⁶⁴.

Sin embargo, el diagnóstico temprano de EA no siempre provoca emociones negativas en las personas y puede brindar alivio²².

Discusión

A lo largo de este informe se aborda la utilidad del estudio molecular mediante qPCR de los haplotipos productos de dos SNPs de *apoE* (rs429358 y rs7412). La determinación de estos polimorfismos da lugar a distintos alelos que se relacionan con distintas susceptibilidades y riesgos de desarrollar ciertas patologías. La evaluación del genotipado de *apoE* por qPCR se sitúa en el contexto del diagnóstico clínico de la DBLP y en su inclusión dentro de un modelo predictivo pronóstico de riesgo de padecer EA de inicio tardío, sin que se hayan identificado estudios que pudieran dar una respuesta adecuada a los objetivos planteados en este informe.

La DBLP se trata de un tipo de dislipemia heredado que potencialmente se encuentra infradiagnosticado. Este desorden está asociado con un riesgo aumentado de padecer enfermedad de tipo coronario y periférica arterial de forma prematura. Aunque hay algunas características clínicas, como los xantomas palmares y tuberosos asociados con esta condición, no siempre se encuentran presentes; por lo que su ausencia no se puede usar como criterio de exclusión de este desorden. La determinación del perfil lipídico por sí sólo no es capaz de diferenciar la DBLP de otras causas de hiperlipidemia combinada, por lo que es necesario la integración de más parámetros para llevar a cabo un correcto diagnóstico.

La determinación convencional de DBLP está basada en la confirmación de un aumento en las partículas remanentes anormales. Esto requiere separación de lipoproteínas por ultracentrifugación y, posteriormente, cuantificación de colesterol y triglicéridos o electroforesis del sobrenadante²⁰. El uso de este algoritmo implica el manejo de la técnica de ultracentrifugación, la cual cuenta con una serie de inconvenientes que hace que únicamente sea accesible en algunos centros: elevado coste, técnica muy laboriosa con necesidad de un personal entrenado; así como limitaciones en su ejecución (por ejemplo, el número de muestras a procesar viene marcada por el número de posiciones con las que cuenta el rotor)⁴. Como alternativa, se ha analizado el uso de diferentes técnicas bioquímicas cuyas principales características fueron abordadas en este informe (Apartado 2.2.2: Disbetalipoproteinemia familiar/Diagnóstico). Entre ellas, se encuentra el uso de la electroforesis con geles de agarosa del plasma/suero para la identificación de la β banda o la medida de la concentración de apoE mediante técnicas inmunocromatográficas⁴.

La técnica de referencia de acuerdo al criterio de Fredrickson para el diagnóstico de DBLP incluye: la medida de TG entre 150-1.000 mg/dL y un cociente colesterol-VLDL/TG > 0,30 mg/dL. Se han propuesto diferentes procedimientos que incluyen el uso de un algoritmo integrado para la detección de la DBLP donde se incluyen distintos parámetros del perfil lipídico del individuo. Normalmente comprenden la medida de colesterol noHDL y TG junto con la determinación de la apoB. El uso de este tipo de criterios diagnósticos y, aunque pudieran tratarse de herramientas útiles, cuentan con importantes limitaciones como por ejemplo: la falta de consenso acerca del umbral óptimo de los biomarcadores o los posibles problemas de alteración del fenotipo bioquímico lipídico que pueden presentar aquellos paciente que siguen un tratamiento hipolipemiente²⁰.

Por otro lado, el genotipado de *apoE* resulta una herramienta especialmente útil a incluir en el diagnóstico de la DBLP. En el contexto de una enfermedad monogénica, su uso podría tener un papel relevante en la confirmación del diagnóstico o su exclusión. La mayoría de los casos para DBLP se deben a un patrón de herencia recesiva por la presencia del alelo $\epsilon 2$ en homocigosis la cual es relativamente fácil de analizar por diferentes técnicas de biología molecular. Sin embargo, es importante recordar que la penetrancia del genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ es baja y este genotipo no se puede considerar un diagnóstico definitivo sin la demostración de la coexistencia de concentraciones elevadas lipoproteínas remanentes. Además, la mayoría de los individuos que presentan un genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ no sufren DBLP; y aproximadamente alrededor de un 10% de los casos se deben a mutaciones autosómicas dominantes raras en el gen *apoE* que sólo pueden ser identificadas mediante secuenciación completa, o al menos del exón 4 del gen.

Las diferentes formas de análisis de las variantes del gen *apoE*, aplicable a otras condiciones, fueron detalladas en la introducción de este informe (ver apartado 3: Determinación molecular de los polimorfismos del gen *apoE*) e incluyen técnicas de fenotipado como la determinación por EIE o la identificación de las variantes mediante PCR-RFLP o secuenciación. En referencia al objetivo de este informe acerca del uso específico de la técnica de qPCR para el análisis de la *apoE* en el contexto del diagnóstico de la DBLP, únicamente se encontró un estudio llevado a cabo por Bea et al¹. El resto de estudios identificados hacían referencia mayoritariamente a otros tipos de técnicas genéticas empleadas para la determinación de *apoE*. El tipo de método de genotipado empleado en los diferentes trabajos generalmente parecía seguir un patrón cronológico. En aquellas publicaciones más antiguas solía predominar la técnica de PCR-RFLP; mientras que en las más recientes el método de elección era la secuenciación del gen. En algunos de

los estudios identificados no se indicaba la técnica de genotipado que se había usado, por lo que fueron descartados.

En el estudio de Bea et al.¹ se propone un nuevo algoritmo diagnóstico para la DBLP. Consiste en la identificación de personas que, con hiperlipidemia (definida de acuerdo a los criterios establecidos en el propio estudio) superen unos umbrales para determinados cocientes de biomarcadores (noHDLc/apoB, TG/apoB) con o sin tratamientos hipolipemiantes. Llegados a este punto, el algoritmo propone la realización de una segunda prueba que incluye un estudio del gen *apoE* para el correcto diagnóstico de DBLP.

Tal y como se ha comentado anteriormente, una de las aproximaciones diagnósticas para DBLP se basa en la medida de la acumulación de lipoproteínas remanentes ricas en TG y colesterol; por lo que es esperable que los cocientes noHDLc/apoB y TG/apoB y la definición de hiperlipidemia sean buenos candidatos a incluir en un algoritmo de detección para DBLP como el propuesto en el trabajo de Bea et al.¹. Como consecuencia de ello, este nuevo algoritmo es altamente sensible (100%), con una especificidad por encima del 85% y todo ello a expensas de no señalar erróneamente a paciente alguno como FN y con un porcentaje de FP en torno al 12,7%, cuando los modelos comparados ofrecen porcentaje de FP entre un 15,0% (741/4954)⁵ y un 64,6% (3199/4954)³. Si en este contexto, se tiene en cuenta el uso del algoritmo propuesto por Bea et al. que, aun contando con numerosas limitaciones, presenta una definición de hiperlipidemia (de acuerdo al criterio de los autores) más amplia, con el consiguiente aumento de su sensibilidad (y de falsos positivos) para una sospecha diagnóstica temprana; la caracterización del genotipado *apoE* ofrece la posibilidad de confirmación o descarte diagnóstico de, al menos, los casos de DBLP homocigota.

En referencia a los objetivos específicos de este informe, una de las limitaciones con las que cuenta es la ausencia de un estudio comparativo directo entre el genotipado de *apoE* por qPCR y otras técnicas de genotipado, para poder establecer conclusiones referentes a las características diagnósticas de ambas pruebas. En el estudio seleccionado de Bea et al.¹ a las personas de la cohorte del AWHS se les realiza este tipo de técnica de detección de los SNP a partir de una pre-mezcla comercial de reactivos tipo TaqMan®. Lamentablemente, a lo largo del estudio, no se establece ningún análisis con el propósito de comparar este método con la secuenciación genética, que es la prueba que se realiza en la cohorte del HUMS. Bea et al. ponen a prueba el nuevo algoritmo diagnóstico en las tres muestras de pacientes con las que cuentan (HUMS, AWHS y Unidades Externas lipídicas), teniendo presente que todos los casos son E2/E2. En las tres muestras se obtiene una sensibilidad del 100%, obteniéndose una especi-

ficidad más alta en la cohorte del HUMS (92,8%) respecto a las demás cohortes (datos no mostrados en el apartado de resultados del informe)¹. Esta diferencia no la podemos atribuir a que la secuenciación sea un método más específico, ya que existen algunas limitaciones en el diseño del propio estudio, como son la clasificación a priori de casos entre aquellas personas con $\epsilon 2/\epsilon 2$, o que en la cohorte HUMS existe una mayor representación de genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ (1% vs. 0,4%). Otra de las limitaciones del informe es la ausencia de estudios con un grupo de comparación cuya técnica fuera considerada la estándar dentro del diagnóstico de DBLP, como es la ultracentrifugación. Tampoco se han identificado estudios que informaran de personas que, con los criterios, por ejemplo, de Bea et al. u otros, presentarían con perfil lipídico alterado y que no contasen con el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$. El diseño de Bea et al, aunque contase con un algoritmo diagnóstico en el que el genotipado es de confirmación para el diagnóstico de DBLP, la selección de casos (estudio retrospectivo) presenta como condición la presencia del genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$. Este hecho ha inducido la no existencia de casos como FN con el empleo de dicho algoritmo.

Una limitación más del informe es la población del estudio seleccionado. Desagrupadas por cohortes, no representan a la población general. Ni las de índole sanitaria, pero ni siquiera la cohorte AWHs que, siendo una muestra de personas en edad laboral, el 93,8% está representada por varones.

Siendo un estudio realizado en España, no se aportan los valores predictivos positivos (VPP) ni los negativos (VPN) debido a que, como se ha señalado previamente, la población de estudio no es representativa de la población general y, además, la prevalencia de la DBLP puede variar según las definiciones de hiperlipidemia y criterios diagnósticos, lo que explica que se manejen cifras de prevalencia de 1:10.000 a 1:50¹. Por este motivo de variabilidad de la prevalencia, y con los datos ofrecidos por Bea et al. se realizó el cálculo de los cocientes de probabilidad positivo (CPP) y negativo (CPN) mostrados en el anexo 8. Con un CPP de 7,8 (IC95%; 7,2 a 8,4) la prueba puede considerarse como poco potente para determinar cuánto más probable es tener un resultado positivo en un enfermo que en un sano⁶⁵. A pesar de ofrecer un CPN = 0, el resultado no es adecuado interpretarlo debido a que se ha obtenido de una muestra de pacientes que fueron seleccionados con genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ como VP y, por tanto, sin FN para el algoritmo propuesto.

El algoritmo diagnóstico propuesto por Bea et al. ofrece mejores resultados en términos de exactitud diagnóstica respecto al resto de modelos con los que es comparado. Sin embargo, según el diseño del estudio, el conjunto

pre seleccionado de personas sobre los que se desarrolla el algoritmo tienen el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$, las cuales se consideran los VP del modelo y, por tanto, es muy probable que la estimación esté sobrevalorando la verdadera exactitud diagnóstica de la prueba¹.

La EA de inicio tardío es la segunda condición de estudio abordada en el informe, cuyo objetivo se centra en la localización de modelos predictivos pronóstico que incluyan el genotipado de *apoE* por qPCR. En este escenario se sitúa una de las manifestaciones de la creciente preocupación sobre el impacto de los desafíos cognitivos relacionados con el envejecimiento. Esta situación ha promovido el desarrollo de estrategias a nivel nacional e internacional para abordar la demencia. Organizaciones internacionales como la “*Alzheimer’s Disease International*” y la Organización Mundial de la Salud han desarrollado planes preventivos, de promoción de la investigación y de uso de recursos⁶⁶.

En el proceso de búsqueda bibliográfica no se identificó ningún estudio que cumpliera con los criterios de inclusión. La mayoría de los estudios localizados, abordaban la inclusión del genotipo *apoE* dentro de diferentes modelos predictivos diagnóstico con el objetivo de alcanzar un algoritmo de clasificación de la enfermedad preciso y exacto. Otros trataban de relacionar la EA con el genotipo *apoE* y la tasa de deterioro cognitivo, una vez que la enfermedad ya ha sido diagnosticada.

Atendiendo a otro de los objetivos planteados de recopilar modelos predictivos pronóstico que incorporaran el estatus de *apoE* con otras técnicas genéticas diferentes a la qPCR, se identificaron un total de 8 trabajos (ver anexo 9: Modelos predictivos pronóstico para establecer riesgo de aparición de EA de inicio tardío que incluyen genotipado *apoE*). Los métodos de genotipado usados en estos modelos pronóstico y los empleados en otros trabajos descartados, vienen condicionados por la fuente de información de pacientes. En cinco de los estudios^{7,9,11-13}, los pacientes proceden del registro ADNI, que para la identificación de los dos SNP de interés (rs429358 y rs7412) emplea la técnica de genotipado por PCR-RFLP⁶¹.

Se ha puesto de manifiesto que, los estudios publicados y de interés para este informe, hacen hincapié en el genotipado *apoE*, y no en la técnica qPCR de genotipado. Se interpreta, por tanto, que la técnica empleada no es lo relevante en el ámbito clínico y que este aspecto puede tener su importancia en el campo de la investigación. No se duda del importante papel de *apoE* en los modelos predictivos para la EA de inicio tardío, dado que se trata del factor de riesgo genético más importante asociado a la enfermedad, junto con otros factores predictores como la edad, el resultado del MMSE o el sexo de la persona¹⁷.

Así mismo, se ha observado que el desarrollo de modelos pronósticos incorporan otros factores predictores novedosos como son biomarcadores de LCR (por ejemplo, medida de la proteína tau fosforilada) o la incorporación de pruebas de imagen sofisticadas y complejas como COX-ROI o ANCOVA-ROI. Esto pone de manifiesto la necesidad de incorporar nuevos factores predictores a los modelos predictivos, con el objetivo de mejorar y anticipar la posible aparición de EA de inicio tardío, pero se observa que los modelos identificados ofrecen la información necesaria para poder aplicar en clínica los modelos pronóstico de manera fragmentada o incompleta (ver anexo 9) y, por tanto, no es posible su adopción e implementación en la práctica clínica diaria. A modo de ejemplo, estudios como Davatzikos et al.⁷ o Kauppi et al.¹³ describen factores predictores, pero no informan de los umbrales para su uso clínico ante un paciente concreto. Modelos propuestos como el de Abdullah et al.⁶ señalan un umbral para clasificar a las personas como de alto o bajo riesgo de desarrollar EA con predictores como el cociente AB_{1-42}/AB_{1-40} , pero no está integrado en un modelo clínico que permita estimar el riesgo individual de la persona, teniendo presentes el resto de factores predictores que influyen en el pronóstico individual.

En relación a la técnica de genotipado de *apoE* mediante qPCR, cabe destacar que se trata de una técnica sensible y específica, así como fácilmente implementable en un servicio de laboratorio diagnóstico; siempre y cuando se disponga del equipo y de personal entrenado. Además, la posibilidad de disponer de mezclas comerciales con o sin los cebadores y sondas incluidos, facilita su realización y la posibilidad de obtener el resultado en unas pocas horas sin requerir otros procedimientos de post-análisis complejos como la PCR-RFLP o cualquier método que implique la preparación de un gel⁴⁵. A favor de otras técnicas tradicionalmente instauradas para conocer el genotipo de *apoE* como es la PCR-RFLP; destaca el no requerir de un termociclador especial con detector de fluorescencia y ser menos costosa que la qPCR por no requerir de sondas. Sin embargo, se trata de un proceso laborioso, en ocasiones la interpretación puede ser dudosa debido a digestión parcial por diferentes factores (por ejemplo, mal estado de la enzima de restricción o producto de PCR “débil”) y con gran cantidad de pasos que aumentan las posibilidades de introducir un error humano^{42,43}.

Pese a las potenciales ventajas que podría aportar la qPCR, no se ha visto que sea el método más extendido de genotipado de *apoE* tanto para la DBLP como para EA de inicio tardío; siendo otros métodos como la PCR-RFLP o secuenciación los más usados. En el caso de DBLP en el único estudio donde se integra esta técnica, los autores apuntan a que sería necesaria no sólo la confirmación del genotipo $\epsilon 2/\epsilon 2$, sino también la secuenciación del gen *apoE* para demostrar otras mutaciones patogénicas en el mismo¹. Probablemente la pérdi-

da de positivos para DBLP debido a otras mutaciones raras, sea una de las limitaciones de la implementación de esta técnica para su diagnóstico.

En referencia a la EA, la disponibilidad de grandes bases de datos con registros de pacientes como, por ejemplo, ADNI o NACC, podría ser una de las causas de la ausencia de estudios que desarrollen modelos pronósticos teniendo en cuenta los resultados de la técnica qPCR. Son registros en los que se cuenta ya con el genotipo (mediante otras técnicas de genotipado) de muchas de las personas que integran estas bases de datos, por lo que supone un ahorro económico importante en la investigación.

Más allá de los objetivos que rodean a este informe en relación al tipo de técnicas empleadas para el genotipado de *apoE* con objetivo diagnóstico para DBLP y su integración en un modelo predictivo pronóstico de EA de inicio tardío; estarían las consideraciones éticas y legales que llevan implícitas la determinación de cualquier información sensible para el paciente.

Es patente la asociación del gen *apoE* con diferentes condiciones como la DBLP y la EA y cómo puede afectar al diagnóstico, pronóstico o incluso a la respuesta al tratamiento. Pero su papel es el de un factor de riesgo y no causativo y, los hallazgos inconsistentes en la literatura sugieren que las enfermedades asociadas a *apoE* son el resultado de interacciones complejas. Por tanto, en un contexto de medicina de precisión, la decisión de evaluar el genotipo *apoE* puede tomarse mejor caso por caso¹⁷.

En referencia a la DBLP, solo una minoría de los portadores $\epsilon 2/\epsilon 2$ desarrollan la enfermedad e incluso, de entre las personas que desarrollan la enfermedad, la mayoría permanecen normolipidémicos durante décadas; particularmente en ausencia de otros factores dislipidémicos primarios o secundarios adicionales. La posibilidad de tener acceso a información sobre el estatus del gen *apoE* podría ser recomendable en pacientes con perfil lipídico sospechoso y/o pacientes con una historia familiar de DBLP, ya que incorporar el conocimiento de la predisposición genética, ofrece la posibilidad de posponer la expresión de la enfermedad instaurando medidas preventivas o mediante el control de los factores dislipémicos. De hecho, la hiperlipidemia combinada que se observa en este tipo de desorden, normalmente suele responder bien a terapia médica y a cambios en el estilo de vida. Por otra parte, en personas con signos y síntomas de la enfermedad, el análisis de *apoE* puede servir como herramienta diagnóstica de confirmación¹⁷. Sin embargo, el análisis genético, sin una causa que lo justifique no es recomendable ya que únicamente identifica personas en riesgo de desarrollar la DBLP, por lo que podría generar una preocupación innecesaria.

La EA presenta implicaciones, entre otras, de carácter ético, legal, social y emocional dado que no se dispone de un tratamiento curativo, que

revierta las lesiones o que prevenga su progresión. Disponer de información catalogada como de “*riesgo incrementando de padecer EA de inicio tardío*” debe ser valorada en términos de potenciales beneficios que puede aportar. Contar con estos datos, en el contexto de la EA, debe implicar preguntarse por el momento adecuado para que el paciente y el clínico dispongan de esta información y, si va a resultar de utilidad para el primero. Además, se debe tener presente que la población puede tomar un papel activo en la promoción de su propia salud que, ligado a la hipótesis de que determinadas medidas preventivas de control de factores de riesgo modificables como la dieta, ejercicio físico o estimulación cognitiva, podrían traducirse, a largo plazo, en un envejecimiento activo y saludable⁴¹, sin tener que recurrir a la identificación de “*riesgos asociados*”.

Sería adecuado tratar de valorar si, para la persona y su entorno familiar, contar con la información sobre su predisposición genética puede motivar a la persona a modificar los factores modificables que estén bajo su control o, por el contrario, puede suponer la adición de un mayor grado de ansiedad y estrés para la persona y, en caso de ser así, si se cuenta con los recursos necesarios para poder ayudar a la persona y a su entorno a gestionarlo. En cualquier caso, cabe recordar que el paciente tiene derecho tanto a contar con esta información como a declinar ser conocedor de la misma⁶⁴.

En general, el genotipado de *apoE* independientemente de la técnica utilizada; en el marco de la medicina de precisión podría ser más efectivo formando parte de un contexto amplio de información clínica del paciente y con una decisión individualizada acerca de su evaluación, tomando en consideración el tipo de patología en la que se desea aplicar. Disponer del genotipado *apoE* podría tener su valor a la hora de tomar decisiones a nivel terapéutico. Existen datos procedentes de ensayos clínicos que muestran como determinados fármacos, en pacientes con EA leve a moderado y portadores del alelo $\epsilon 4$, inducen una reducción de las concentraciones de p-tau y A β , sin que se observen estos beneficios en los no portadores. Sucede lo mismo con el manejo de las dislipidemias, y las respuestas a estatinas y fibratos. Mientras los portadores de $\epsilon 4$ muestran una respuesta escasa a la terapia hipolipemiente, las personas con $\epsilon 2$ muestran una respuesta de alta eficacia a la misma terapia¹⁷.

Otro de los aspectos que debe tenerse en cuenta, tal como señalan Wells et al. y que puede ser extrapolable a cualquier escenario con componentes genéticos, es la necesidad de informar adecuadamente a los pacientes del concepto “*predisposición genética*”; donde la presencia de un genotipo *apoE* de riesgo no es condición necesaria ni suficiente para el desarrollo de la enfermedad y, por tanto, esta información puede generar un nivel de ansiedad innecesario²².

Conclusiones

ApoE es una proteína conocida por el papel que juega en el transporte del colesterol y otros lípidos en la circulación sanguínea y SNC, así como su valor diagnóstico y pronóstico de diversas enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Dado el polimorfismo del gen codificante, se puede presentar con distintas isoformas. La isoforma $\epsilon 3$ de apoE es la más común, representando el 80% de los alelos en humanos. El alelo $\epsilon 4$ se presenta entre el 10% y 15% de la población y se asocia a un mayor riesgo de desórdenes cerebrovasculares, con una asociación marcada con la EA de inicio tardío, mientras que el alelo $\epsilon 2$, con una prevalencia entre el 5% y 10% se asocia a dislipidemias como la DBLP.

Dado su papel biológico relevante en el metabolismo humano de los lípidos, se han desarrollado, a lo largo del tiempo, diferentes técnicas que permiten analizar los polimorfismos del gen *apoE* y las isoformas que se generan.

El genotipado de *apoE* en el contexto diagnóstico de la DBLP, se suele usar como parámetro confirmatorio y complementario a otras pruebas que, generalmente incluyen análisis del perfil lipídico. Se trata de personas que presentan, de entrada, alteraciones lipídicas y signos y síntomas susceptibles de esta condición.

Para el análisis de las variantes genética de *apoE*, la técnica de PCR-RFLP o la secuenciación, fueron las técnicas que más aparecieron informadas en la bibliografía, respecto a la técnica por qPCR.

El único estudio identificado, con aplicación clínica para la DBLP y que informa del genotipado de *apoE* con qPCR, no establece comparaciones con otras técnicas de genotipado ni fenotipado de *apoE*. Por tanto, no hay información sobre su aplicabilidad en la clínica y consecuente fiabilidad diagnóstica.

Existen pruebas de que la qPCR presenta ventajas sobre otras técnicas de genotipado en términos de rapidez de obtención del resultado y factibilidad; elementos que no son primordiales para el abordaje de las afecciones analizadas en este informe.

Dado que la DBLP puede presentarse como una entidad homocigótica con alelos $\epsilon 2/\epsilon 2$ o con otras variantes genéticas de carácter autosómico dominante, el empleo de la técnica de genotipado de *apoE* mediante qPCR

podría infradiagnosticar en torno a un 10% de personas como FN por presentarse con variantes genéticas autosómicas dominantes.

Debido a la ausencia de pruebas que puedan avalar su papel en el contexto clínico, no es posible recomendar la incorporación rutinaria de la técnica de qPCR en el diagnóstico de la DBLP.

Para el estudio de la EA de inicio tardío que incluya el genotipado *apoE*, predomina el desarrollo y validación de modelos predictivos diagnóstico frente a los modelos predictivos pronóstico que, eran el objeto de este informe.

No hay evidencias del uso de la tecnología de qPCR para caracterizar el gen *apoE* e incorporar esta información en el desarrollado de modelos pronóstico para el estudio de la EA de inicio tardío.

La mayoría de los modelos predictivos pronóstico identificados, emplean la información procedente de registros de pacientes como ADNI, quienes fueron genotipados por la técnica de PCR-RFLP.

No hay evidencias científicas que permitan confirmar que, la técnica de qPCR para el genotipado de *apoE* e integración dicha información en un modelo pronóstico para una detección temprana de la EA de inicio tardío, suponga una mejora para el manejo de estas personas con sospecha de EA de inicio tardío, respecto a la información que puede incorporarse con los resultados de otras técnicas de genotipado disponibles en la actualidad.

En un entorno de medicina de precisión e independientemente de la técnica de genotipado empleada para la caracterización del gen *apoE*, disponer de esta información puede ser relevante para, de una manera individualizada, en personas con manifestaciones y/o alteraciones bioquímicas lipídicas, la adopción temprana de medidas terapéuticas en el caso de la DBLP homocigótas y, en personas con sospecha de EA de inicio tardío (60 años o más de edad), la puesta en marcha de medidas que permitan modificar los factores de riesgo que puedan estar bajo el control de la persona y familiares y, teniendo presentes los recursos disponibles en su entorno para informar adecuadamente a la persona y acceder a los mismos en caso de necesidad.

Futuras líneas de investigación

Se requiere de estudios que comparen la qPCR para la caracterización del gen *apoE* en el contexto clínico, y especialmente de la DBLP, con el objetivo de evaluar su papel diagnóstico respecto a otras técnicas ya instauradas como la PCR-RFLP o la secuenciación.

El desarrollo y validación de cualquier algoritmo diagnóstico para la DBLP debería contar con los resultados comparables del estándar de referencia actual; la ultracentrifugación. Así mismo, el diseño de los estudios debería contemplar a todos los perfiles genéticos de la DBLP e independientemente del estado de toma de fármacos hipolipemiantes, con el objetivo de disponer de una cuantificación real de la fiabilidad de la técnica de qPCR.

Se necesitan estudios que desarrollen y validen modelos predictivos pronóstico para la identificación temprana de personas a riesgo de desarrollar EA de inicio tardío y que cuenten con la información proveniente del uso de la tecnología qPCR para la caracterización del gen *apoE*. Es preciso que los modelos cuenten con una descripción detallada de los factores predictores incorporados al modelo, así como de sus umbrales para poder disponer de una herramienta de uso clínico que facilite la toma de decisiones compartidas con el paciente y familiares.

Bibliografía

1. Bea AM, Cenarro A, Marco-Bened V, Laclaustra M, Martn C, Ibarretxe D, et al. Diagnosis of Familial Dysbetalipoproteinemia Based on the Lipid Abnormalities Driven by APOE2/E2 Genotype. *Clin Chem*. 2023;69(2):140-8. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvac213>.
2. Sniderman AD, de Graaf J, Thanassoulis G, Tremblay AJ, Martin SS, Couture P. The spectrum of type III hyperlipoproteinemia. *J Clin Lipidol*. 2018;12(6):1383-9. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2018.09.006>.
3. Paquette M, Bernard S, Blank D, Paré G, Baass A. A simplified diagnosis algorithm for dysbetalipoproteinemia. *J Clin Lipidol*. 2020;14(4):431-7. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2020.06.004>.
4. Boot CS, Luvai A, Neely RDG. The clinical and laboratory investigation of dysbetalipoproteinemia. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020;57(7):458-69. <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1745142>.
5. Sampson M, Wolska A, Meeusen JW, Donato LJ, Jaffe AS, Remaley AT. Identification of Dysbetalipoproteinemia by an Enhanced Sampson-NIH Equation for Very Low-Density Lipoprotein-Cholesterol. *Front Genet*. 2022;13:935257. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.935257>.
6. Abdullah L, Luis C, Paris D, Mouzon B, Ait-Ghezala G, Keegan AP, et al. Serum A beta Levels as Predictors of Conversion to Mild Cognitive Impairment/Alzheimer Disease in an ADAPT Subcohort. *Molecular Medicine*. 2009;15(11-12):432-7. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00083>.
7. Davatzikos C, Da X, Toledo JB, Zee J, Wolk DA, Xie SX, et al. Integration and relative value of biomarkers for prediction of MCI to AD progression: Spatial patterns of brain atrophy, cognitive scores, APOE genotype and CSF biomarkers. *NeuroImage: Clinical*. 2014;4:164-73. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.11.010>.
8. Hartz SM, Mozersky J, Schindler SE, Linnenbringer E, Wang J, Gordon BA, et al. A flexible modeling approach for biomarker-based computation of absolute risk of Alzheimer's disease dementia. *Alzheimers Dement*. 2023;19(4):1452-65. <https://doi.org/10.1002/alz.12781>.

9. Qiu Y, Li L, Zhou TY, Lu W, Alzheimer's Dis N. Alzheimer's disease progression model based on integrated biomarkers and clinical measures. *Acta Pharmacol Sin.* 2014;35(9):1111-20. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.57>.
10. Shigemizu D, Akiyama S, Higaki S, Sugimoto T, Sakurai T, Boroevich KA, et al. Prognosis prediction model for conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease created by integrative analysis of multi-omics data. *Alzheimers Res Ther.* 2020;12(1):145. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00716-0>.
11. Sørensen A, Blazhenets G, Rücker G, Schiller F, Meyer PT, Frings L. Prognosis of conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer's dementia by voxel-wise Cox regression based on FDG PET data. *NeuroImage Clinical.* 2019;21:101637. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.101637>.
12. van Maurik IS, van der Kall LM, de Wilde A, Bouwman FH, Scheltens P, van Berckel BNM, et al. Added value of amyloid PET in individualized risk predictions for MCI patients. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring.* 2019;11:529-37. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2019.04.011>.
13. Kauppi K, Fan CC, McEvoy LK, Holland D, Tan CH, Chen CH, et al. Combining polygenic hazard score with volumetric MRI and cognitive measures improves prediction of progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience.* 2018;12(APR). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00260>.
14. Lumsden AL, Mulugeta A, Zhou A, Hyppönen E. Apolipoprotein E (APOE) genotype-associated disease risks: a phenome-wide, registry-based, case-control study utilising the UK Biobank. *EBioMedicine.* 2020;59:102954. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102954>.
15. Martínez-Martínez AB, Torres-Perez E, Devanney N, Del Moral R, Johnson LA, Arbones-Mainar JM. Beyond the CNS: The many peripheral roles of APOE. *Neurobiol Dis.* 2020;138:104809. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104809>.
16. Troutwine BR, Hamid L, Lysaker CR, Strobe TA, Wilkins HM. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Acta Pharm Sin B.* 2022;12(2):496-510. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.10.002>.
17. Villeneuve S, Brisson D, Marchant NL, Gaudet D. The potential applications of apolipoprotein E in personalized medicine. *Front Aging Neurosci.* 2014;6(JUL). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00154>.

18. Vecchio FL, Bisceglia P, Imbimbo BP, Lozupone M, Latino RR, Resta E, et al. Are apolipoprotein E fragments a promising new therapeutic target for Alzheimer's disease? *Ther Adv Chronic Dis.* 2022;13:20406223221081605. <https://doi.org/10.1177/20406223221081605>.
19. Javvaji A, Can AS, Sharma S. *Dysbetalipoproteinemia.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.; 2023.
20. Cenarro A, Bea AM, Gracia-Rubio I, Civeira F. [Dysbetalipoproteinemia and other lipid abnormalities related to apo E]. *Clin Investig Arterioscler.* 2021;33 Suppl 2:50-5. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2021.01.002>.
21. Heidemann BE, Koopal C, Baass A, Defesche JC, Zuurbier L, Mulder MT, et al. Establishing the relationship between familial dysbetalipoproteinemia and genetic variants in the APOE gene. *Clin Genet.* 2022;102(4):253-61. <https://doi.org/10.1111/cge.14185>.
22. Wells C, Horton J. An Overview of New and Emerging Technologies for Early Diagnosis of Alzheimer Disease. *Canadian Journal of Health Technologies.* 2022;2(5):1-18.
23. Botchway BO, Okoye FC, Chen Y, Arthur WE, Fang M. Alzheimer Disease: Recent Updates on Apolipoprotein E and Gut Microbiome Mediation of Oxidative Stress, and Prospective Interventional Agents. *Aging Dis.* 2022;13(1):87-102. <https://doi.org/10.14336/ad.2021.0616>.
24. Kirmess KM, Meyer MR, Holubasch MS, Knapik SS, Hu Y, Jackson EN, et al. The PrecivityAD™ test: Accurate and reliable LC-MS/MS assays for quantifying plasma amyloid beta 40 and 42 and apolipoprotein E proteotype for the assessment of brain amyloidosis. *Clin Chim Acta.* 2021;519:267-75. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.05.011>.
25. Kamboh MI. Genomics and Functional Genomics of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics.* 2022;19(1):152-72. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01152-0>.
26. Villarejo Galende A, Eimil Ortiz M, Llamas Velasco S, Llanero Luque M, López de Silanes de Miguel C, Prieto Jurczynska C. Informe de la Fundación del Cerebro. Impacto social de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Neurología.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.10.005>.
27. Dubois B, Villain N, Frisoni GB, Rabinovici GD, Sabbagh M, Cappa S, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group. *Lancet Neurol.* 2021;20(6):484-96. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(21\)00066-1](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(21)00066-1).

28. Camacho V, Gómez-Grande A, Sopena P, García-Solís D, Gómez Río M, Lorenzo C, et al. PET amiloide en enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. *Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.remnm.2018.03.004>.
29. AltPep. SOBA™ Diagnostics [Internet]. 2023 [citado Junio 2023]. Disponible en: <https://www.altpep.com/product-pipeline/>.
30. Diadem. ALZOSURE® PREDICT [Internet]. 2023 [citado Junio 2023]. Disponible en: <https://diademdx.com/alzsure-predict/>.
31. BrightFocus Foundation. Treatments for Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Disease Research* [Internet]. 2021 [Última actualización 2 de noviembre de 2021] [citado 6 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.brightfocus.org/alzheimers/article/treatments-alzheimers-disease>.
32. Harris E. Alzheimer Drug Lecanemab Gains Traditional FDA Approval. *JAMA*. 2023. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.12548>.
33. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2022;388(1):9-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>.
34. Molchan S, Fugh-Berman A. Are New Alzheimer Drugs Better Than Older Drugs? *JAMA Internal Medicine*. 2023. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2023.3061>.
35. Mintun MA, Lo AC, Duggan Evans C, Wessels AM, Ardayfio PA, Andersen SW, et al. Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(18):1691-704. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2100708>.
36. Sims JR, Zimmer JA, Evans CD, Lu M, Ardayfio P, Sparks J, et al. Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2023;330(6):512-27. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.13239>.
37. Alves F, Kalinowski P, Ayton S. Accelerated Brain Volume Loss Caused by Anti- β -Amyloid Drugs: A Systematic Review and Meta-analysis. *NEUROLOGY*. 2023;100(20):e2114-e24. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000207156>.
38. La Revue Prescrire. Pour Mieux Soigner, des Médicaments à Écarter - Bilan 2023. *Rev Prescrire*. 2022;42(470):936-48.
39. Liu KY, Schneider LS, Howard R. The need to show minimum clinically important differences in Alzheimer's disease trials. *Lancet Psychiatry*. 2021;8(11):1013-6. [https://doi.org/10.1016/s2215-0366\(21\)00197-8](https://doi.org/10.1016/s2215-0366(21)00197-8).

40. Meglio M. Se actualiza la etiqueta del aducanumab para incluir los riesgos de hemorragia cerebral. *Boletín Fármacos*. 2023;26(2):25.
41. Grupo Estatal de Demencias. Plan integral de Alzheimer y otras demencias (2019-2023). Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. 2019. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/docs/Plan_Integral_Alzheimer_Octubre_2019.pdf
42. Bolla MK, Wood N, Humphries SE. Rapid determination of apolipoprotein E genotype using a heteroduplex generator. *J Lipid Res*. 1999;40(12):2340-5.
43. Pantelidis P, Lambert-Hammill M, Wierzbicki AS. Simple sequence-specific-primer-PCR method to identify the three main apolipoprotein E haplotypes. *Clin Chem*. 2003;49(11):1945-8. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.021683>.
44. Zhong L, Xie YZ, Cao TT, Wang Z, Wang T, Li X, et al. A rapid and cost-effective method for genotyping apolipoprotein E gene polymorphism. *Mol Neurodegener*. 2016;11:2. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0069-4>.
45. Bio-Rad Laboratories, Inc. Real-Time PCR. Application Guide. 2006. Disponible en: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf
46. Zhan XH, Zha GC, Jiao JW, Yang LY, Zhan XF, Chen JT, et al. Rapid identification of apolipoprotein E genotypes by high-resolution melting analysis in Chinese Han and African Fang populations. *Exp Ther Med*. 2015;9(2):469-75. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.2097>.
47. Rihn BH, Berrahmoune S, Jouma M, Chamaa S, Marcocci L, Le Faou A. APOE genotyping: comparison of three methods. *Clin Exp Med*. 2009;9(1):61-5. <https://doi.org/10.1007/s10238-008-0012-2>.
48. Calero O, Hortigüela R, Bullido MJ, Calero M. Apolipoprotein E genotyping method by real time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan and FRET assays. *J Neurosci Methods*. 2009;183(2):238-40. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.06.033>.
49. Creative Biogene. Human APOE genotypes ($\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$) Real Time PCR Kit [Internet]. 2023 [citado Mayo 2023]. Disponible en: <https://www.creative-biogene.com/human-apoe-genotypes-2-3-4-real-time-pcr-item-nd-01-2502.html>.
50. SolGent. DiaPlexQ™ Apolipoprotein E (ApoE) Genotyping Kit. Real-Time PCR based assay system for the genotyping of the ApoE

gene SNP related to alzheimer's disease CE-IVD [Internet]. 2023 [citado Mayo 2023]. Disponible en: <http://www.solgent.com/english/sub03010101/view/id/69.?ckattempt=1>.

51. Thermo Fisher Scientific. SNP Genotyping Analysis Using TaqMan Assays. The proven gold standard for detection and discrimination of virtually every SNP of interest [Internet]. 2023 [citado Junio 2023]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home.html>.
52. Koopal C, Marais AD, Westerink J, Visseren FL. Autosomal dominant familial dysbetalipoproteinemia: A pathophysiological framework and practical approach to diagnosis and therapy. *J Clin Lipidol*. 2017;11(1):12-23.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.10.001>.
53. Castro J, Acosta H. Mapa de análisis genéticos que se realizan en España en el marco del Sistema Nacional de Salud. Actualización. Ministerio de Sanidad; Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. Consejería de Salud; Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias: AETSA. 2019.
54. Whiting P, Savović J, Higgins JP, Caldwell DM, Reeves BC, Shea B, et al. ROBIS: A new tool to assess risk of bias in systematic reviews was developed. *J Clin Epidemiol*. 2016;69:225-34. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2015.06.005>.
55. Moons KG, de Groot JA, Bouwmeester W, Vergouwe Y, Mallett S, Altman DG, et al. Critical appraisal and data extraction for systematic reviews of prediction modelling studies: the CHARMS checklist. *PLoS Med*. 2014;11(10):e1001744. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001744>.
56. Moons KGM, Wolff RF, Riley RD, Whiting PF, Westwood M, Collins GS, et al. PROBAST: A Tool to Assess Risk of Bias and Applicability of Prediction Model Studies: Explanation and Elaboration. *Ann Intern Med*. 2019;170(1):W1-w33. <https://doi.org/10.7326/m18-1377>.
57. López de Argumedo M RE, Gutiérrez A, Bayón JC. Actualización del Sistema de Trabajo Compartido para Revisiones Sistemáticas de la Evidencia Científica y Lectura Crítica (Plataforma FLC 3.0). Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias: OSTEBA. 2017. <http://www.lecturacritica.com/es/acceder-a-las-fichas.php>
58. Guyatt GH, Oxman AD, Schünemann HJ, Tugwell P, Knottnerus A. GRADE guidelines: a new series of articles in the Journal of Clinical Epidemiology. *J Clin Epidemiol*. 2011;64(4):380-2. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2010.09.011>.

59. Guyatt GH, Oxman AD, Kunz R, Atkins D, Brozek J, Vist G, et al. GRADE guidelines: 2. Framing the question and deciding on important outcomes. *J Clin Epidemiol*. 2011;64(4):395-400. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2010.09.012>.
60. MedCalc®. Statistical software [Internet]. 2023 [citado Junio 2023]. Disponible en: <https://www.medcalc.org/calc/>.
61. Saykin AJ, Shen L, Foroud TM, Potkin SG, Swaminathan S, Kim S, et al. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative biomarkers as quantitative phenotypes: Genetics core aims, progress, and plans. *Alzheimers Dement*. 2010;6(3):265-73. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2010.03.013>.
62. Talbot C, Lendon C, Craddock N, Shears S, Morris JC, Goate A. Protection against Alzheimer's disease with apoE epsilon 2. *Lancet*. 1994;343(8910):1432-3. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)92557-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)92557-7).
63. Gutiérrez-Ibarluzea I, Ibarгойen-Roteta N, Galnares-Cordero L, Benguria-Arrate G, Calvo M, Arana-Arri E, et al. Listado de comprobación en los dominios de análisis ético y legal. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco. Informes de Evaluación de Tecnologías sanitarias: OSTEBA. 2018.
64. España. Ley 41/2002 de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. *Boletín Oficial del Estado*, 15 de noviembre de 2002, núm: 274, pp. 40126-40132.
65. Molina Arias M, Ochoa Sangrador C. Evaluación de las pruebas diagnósticas (III). Cocientes de probabilidades. *Evid Pediatr*. 2016;12:69.
66. Whitehouse PJ. Ethical issues in early diagnosis and prevention of Alzheimer disease. *Dialogues Clin Neurosci*. 2019;21(1):101-8. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2019.21.1/pwhitehouse>.
67. Miguel Soca PE. Dislipidemias. *ACIMED*. 2009;20(6):265-73.
68. Muñoz Calvo MT. Dislipemias. *Pediatr Integral* 2015;XIX(5):355-64.
69. Abou Khalil Y, Rabes J-P, Boileau C, Varret M. APOE gene variants in primary dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 2021;328:11-22. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.05.007>.
70. Ahmed F, El-Kadiki A, Gibbons S. Comparison of Lipoprotein Electrophoresis and Apolipoprotein E Genotyping in Investigating Dysbetalipoproteinemia. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2017;27(6):378-9.

71. Berberich AJ, Hegele RA. The role of genetic testing in dyslipidaemia. *Pathology*. 2019;51(2):184-92. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.10.014>.
72. Blom DJ, Byrnes P, Jones S, Marais AD. Dysbetalipoproteinaemia--clinical and pathophysiological features. *S Afr Med J*. 2002;92(11):892-7.
73. Corsetti JP, Sparks CE, Bakker SJL, Gruppen EG, Dullaart RPF. Roles of high apolipoprotein E blood levels and HDL in development of familial dysbetalipoproteinemia in epsilon 2 epsilon 2 subjects. *Clinical Biochemistry*. 2018;52:67-72. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.11.010>.
74. Cortés L, Peñalver F, Corral M, Romero F, Cano R. Something more than a poorly controlled dyslipaemia. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*. 2009;21(5):240-3. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(09\)72686-5](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(09)72686-5).
75. Evans D, Seedorf U, Beil FU. Polymorphisms in the apolipoprotein A5 (APOA5) gene and type III hyperlipidemia. *Clinical Genetics*. 2005;68(4):369-72. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00510.x>.
76. Ferreira C, Carvalho M, Fernandes A, Lima L, Loures-Valle A, Dantas J, et al. Comparative study of apolipoprotein-E polymorphism and plasma lipid levels in dyslipidemic and asymptomatic subjects, and their implication in cardio/cerebro-vascular disorders. *Neurochemistry International*. 2010;56(1):177-82. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.09.016>.
77. Hameed ST, Al-Mayah QS, Khudhair MS, Al-Shamma GA. Estimation of Dysbetalipoproteinemia Incidence in Iraqi Patients with Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*. 2022;16(4):469-72. <https://doi.org/10.53350/pjmhs22164469>.
78. Heidemann BE, Wolters FJ, Kavousi M, Gruppen EG, Dullaart RPF, Marais AD, et al. Adiposity and the development of dyslipidemia in APOE epsilon 2 homozygous subjects: A longitudinal analysis in two population-based cohorts. *Atherosclerosis*. 2021;325:57-62. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.04.001>.
79. Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, McIntyre AD, Ban MR, Martins RA, et al. An Increased Burden of Common and Rare Lipid-Associated Risk Alleles Contributes to the Phenotypic Spectrum of Hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2011;31(8):1916-U460. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.111.226365>.

80. Judson R, Brain C, Dain B, Windemuth A, Ruano G, Reed C. New and confirmatory evidence of an association between APOE genotype and baseline C-reactive protein in dyslipidemic individuals. *Atherosclerosis*. 2004;177(2):345-51. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.07.012>.
81. Koopal C, van der Graaf Y, Asselbergs FW, Westerink J, Visseren FL. Influence of APOE-2 genotype on the relation between adiposity and plasma lipid levels in patients with vascular disease. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(2):265-9. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.105>.
82. Lazzaretti RK, Gasparotto AS, Sassi MG, Polanczyk CA, Kuhmmer R, Silveira JM, et al. Genetic Markers Associated to Dyslipidemia in HIV-Infected Individuals on HAART. *Scientific World Journal*. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/608415>.
83. Limonova AS, Ershova AI, Meshkov AN, Kiseleva AV, Divashuk MG, Kutsenko VA, et al. Case report: Hypertriglyceridemia and premature atherosclerosis in a patient with apolipoprotein e gene $\epsilon 2\epsilon 1$ genotype. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021;7. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.585779>.
84. Marais AD, Solomon GA, Blom DJ. Dysbetalipoproteinaemia: a mixed hyperlipidaemia of remnant lipoproteins due to mutations in apolipoprotein E. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014;51(1):46-62. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.870526>.
85. Marais D. Dysbetalipoproteinemia: an extreme disorder of remnant metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26(4):292-7. <https://doi.org/10.1097/mol.0000000000000192>.
86. Paquette M, Bernard S, Paré G, Baass A. Dysbetalipoproteinemia: Differentiating Multifactorial Remnant Cholesterol Disease From Genetic ApoE Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022;107(2):538-48. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab648>.
87. Paquette M, Bernard S, Baass A. Diagnosis of remnant hyperlipidaemia. *Curr Opin Lipidol*. 2022;33(4):227-30. <https://doi.org/10.1097/mol.0000000000000831>.
88. Pieri K, Trichia E, Neville MJ, Taylor H, Bennett D, Karpe F, et al. Polygenic risk in Type III hyperlipidaemia and risk of cardiovascular disease: An epidemiological study in UK Biobank and Oxford Biobank. *International journal of cardiology*. 2023;373:72-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2022.11.024>.

89. Sinnott BP, Mazzone T. Tuberous xanthomas associated with olanzapine therapy and hypertriglyceridemia in the setting of a rare apolipoprotein E mutation. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2006;12(2):183-7.
90. Smelt AH, de Beer F. Apolipoprotein E and familial dysbetalipoproteinemia: clinical, biochemical, and genetic aspects. *Semin Vasc Med*. 2004;4(3):249-57. <https://doi.org/10.1055/s-2004-861492>.
91. Solanas-Barca M, de Castro-Orós I, Mateo-Gallego R, Cofán M, Plana N, Puzo J, et al. Apolipoprotein E gene mutations in subjects with mixed hyperlipidemia and a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2012;222(2):449-55. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.011>.
92. Torres N, Guevara-Cruz M, Granados J, Vargas-Alarcon G, Gonzalez-Palacios B, Ramos-Barragan VE, et al. Reduction of serum lipids by soy protein and soluble fiber is not associated with the ABCG5/G8, apolipoprotein E, and apolipoprotein A1 polymorphisms in a group of hyperlipidemic Mexican subjects. *Nutrition Research*. 2009;29(10):728-35. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.013>.
93. Torres-Perez E, Ledesma M, Garcia-Sobreviela MP, Leon-Latre M, Arbones-Mainar JM. Apolipoprotein E4 association with metabolic syndrome depends on body fatness. *Atherosclerosis*. 2016;245:35-42. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.029>.
94. Wierzbicki AS, Kim EJ, Esan O, Ramachandran R. Hypertriglyceridaemia: an update. *Journal of Clinical Pathology*. 2022;75(12):798-806. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-207719>.
95. Aguilar C, Muehlboeck JS, Mecocci P, Vellas B, Tsolaki M, Kloszewska I, et al. Application of a MRI based index to longitudinal atrophy change in Alzheimer disease, mild cognitive impairment and healthy older individuals in the AddNeuroMed cohort. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:1-12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00145>.
96. Altmann A, Scelsi MA, Shoai M, de Silva E, Aksman LM, Cash DM, et al. A comprehensive analysis of methods for assessing polygenic burden on Alzheimer's disease pathology and risk beyond APOE. *Brain Communications*. 2020;2(1). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcz047>.
97. Ampuero I, Ros R, Royuela A, Abaira V, del Ser T, Garcia-Ribas G, et al. Risk factors for dementia of Alzheimer type and aging-associated

cognitive decline in a Spanish population based sample, and in brains with pathology confirmed Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2008;14(2):179-91. <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad00833>

98. Arbeev KG, Bagley O, Yashkin AP, Duan HZ, Akushevich I, Ukrainitseva SV, et al. Understanding Alzheimer's disease in the context of aging: Findings from applications of stochastic process models to the Health and Retirement Study. *Mech Ageing Dev.* 2023;211. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111791>.
99. Arbizu J, Prieto E, Martinez-Lage P, Marti-Climent JM, Garcia-Granero M, Lamet I, et al. Automated analysis of FDG PET as a tool for single-subject probabilistic prediction and detection of Alzheimer's disease dementia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2013;40(9):1394-405. <https://doi.org/10.1007/s00259-013-2458-z>.
100. Bertens D, Tijms BM, Scheltens P, Teunissen CE, Visser PJ. Unbiased estimates of cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42 cutoffs in a large memory clinic population. *Alzheimers Res Ther.* 2017;9. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0233-7>.
101. Blazhenets G, Ma YL, Sorensen A, Schiller F, Rucker G, Eidelberg D, et al. Predictive Value of F-18-Florbetapir and F-18-FDG PET for Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer Dementia. *J Nucl Med.* 2020;61(4):597-603. <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.230797>.
102. Blenkinsop A, van der Flier WM, Wolk D, Lehmann M, Howard R, Frost C, et al. Non-memory cognitive symptom development in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2020;27(6):995-1002. <https://doi.org/10.1111/ene.14185>.
103. Brookes AJ, Prince JA. Genetic association analysis: lessons from the study of Alzheimers Disease. *Mutat Res.* 2005;573(1-2):152-9. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.017>.
104. Callahan BL, Ramirez J, Berezuk C, Duchesne S, Black SE, Alzheimers Dis Neuroimaging I. Predicting Alzheimer's disease development: a comparison of cognitive criteria and associated neuroimaging biomarkers. *Alzheimers Res Ther.* 2015;7. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0152-z>.
105. Chen Y, Qian X, Zhang Y, Su W, Huang Y, Wang X, et al. Prediction Models for Conversion From Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's

- Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2022;14.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.840386>.
106. Chen J, Dai AX, Tang HL, Lu CH, Liu HX, Hou T, et al. Increase of ALCAM and VCAM-1 in the plasma predicts the Alzheimer's disease. *Front Immunol*. 2023;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1097409>.
 107. Chiba-Falek O, Lutz MW. Towards precision medicine in Alzheimer's disease: deciphering genetic data to establish informative biomarkers. *Expert Rev Precis Med Drug Dev*. 2017;2(1):47-55.
<https://doi.org/10.1080/23808993.2017.1286227>.
 108. Choo IH, Ni RQ, Scholl M, Wall A, Almkvist O, Nordberg A. Combination of F-18-FDG PET and Cerebrospinal Fluid Biomarkers as a Better Predictor of the Progression to Alzheimer's Disease in Mild Cognitive Impairment Patients. *J Alzheimers Dis*. 2013;33(4):929-39.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121489>.
 109. Dang C, Harrington KD, Lim YY, Ames D, Hassenstab J, Laws SM, et al. Relationship Between Amyloid-beta Positivity and Progression to Mild Cognitive Impairment or Dementia over 8 Years in Cognitively Normal Older Adults. *J Alzheimers Dis*. 2018;65(4):1313-25.
<https://doi.org/10.3233/JAD-180507>.
 110. Delvaux E, Mastroeni D, Nolz J, Chow N, Sabbagh M, Caselli RJ, et al. Multivariate analyses of peripheral blood leukocyte transcripts distinguish Alzheimer's, Parkinson's, control, and those at risk for developing Alzheimer's. *Neurobiol Aging*. 2017;58:225-37.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.05.012>.
 111. Devanand DP, Pelton GH, Zamora D, Liu XH, Tabert MH, Goodkind M, et al. Predictive utility of apolipoprotein E genotype for Alzheimer disease in outpatients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2005;62(6):975-80. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.6.975>.
 112. Drzezga A, Grimmer T, Riemenschneider M, Lautenschlager N, Siebner H, Alexopoulos P, et al. Prediction of individual clinical outcome in MCI by means of genetic assessment and (18)F-FDG PET. *J Nucl Med*. 2005;46(10):1625-32.
 113. Escott-Price V, Sims R, Bannister C, Harold D, Vronskaya M, Majounie E, et al. Common polygenic variation enhances risk prediction for Alzheimer's disease. *Brain*. 2015;138(Pt 12):3673-84.
<https://doi.org/10.1093/brain/awv268>.
 114. Ezzati A, Zammit AR, Harvey DJ, Habeck C, Hall CB, Lipton RB, et al. Optimizing Machine Learning Methods to Improve Predictive

- Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2019;71(3):1027-36. <https://doi.org/10.3233/JAD-190262>.
115. Fan CC, Banks SJ, Thompson WK, Chen CH, McEvoy LK, Tan CH, et al. Sex-dependent autosomal effects on clinical progression of Alzheimer's disease. *Brain.* 2020;143:2272-80. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa164>.
 116. Fleisher AS, Sowell BB, Taylor C, Gamst AC, Petersen RC, Thal LJ. Clinical predictors of progression to Alzheimer disease in amnesic mild cognitive impairment. *Neurology.* 2007;68(19):1588-95. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000258542.58725.4c>.
 117. Fleisher AS, Sun S, Taylor C, Ward CP, Gamst AC, Petersen RC, et al. Volumetric MRI vs clinical predictors of Alzheimer disease in mild cognitive impairment. *Neurology.* 2008;70(3):191-9. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000287091.57376.65>.
 118. Forlenza OV, Diniz BS, Teixeira AL, Ojopi EB, Talib LL, Mendonça VA, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and serum levels on the progression of mild cognitive impairment. *World J Biol Psychiatry.* 2010;11(6):774-80. <https://doi.org/10.3109/15622971003797241>.
 119. Giorgio J, Landau SM, Jagust WJ, Tino P, Kourtzi Z, Alzheimers Dis Neuroimaging I. Modelling prognostic trajectories of cognitive decline due to Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin.* 2020;26. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2020.102199>.
 120. Gomar JJ, Conejero-Goldberg C, Davies P, Goldberg TE. Extension and refinement of the predictive value of different classes of markers in ADNI: four-year follow-up data. *Alzheimers Dement.* 2014;10(6):704-12. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.11.009>.
 121. Hane F, Augusta C, Bai O. A hierarchical Bayesian model to predict APOE4 genotype and the age of Alzheimer's disease onset. *PLoS One.* 2018;13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200263>.
 122. Huang S, Qi-Gautier L, Amzal B. PND81 prediction of Alzheimer's disease (AD) from asymptomatic stages using machine learning (ML) models. *Value in health.* 2020;23:S274. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2020.04.973>.
 123. Jia L, Li F, Wei C, Zhu M, Qu Q, Qin W, et al. Prediction of Alzheimer's disease using multi-variants from a Chinese genome-wide association study. *Brain.* 2021;144(3):924-37. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa364>.

124. Khan W, Aguilar C, Kiddle SJ, Doyle O, Thambisetty M, Muehlboeck S, et al. A Subset of Cerebrospinal Fluid Proteins from a Multi-Analyte Panel Associated with Brain Atrophy, Disease Classification and Prediction in Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134368>.
125. Kikuchi M, Kobayashi K, Itoh S, Kasuga K, Miyashita A, Ikeuchi T, et al. Identification of mild cognitive impairment subtypes predicting conversion to Alzheimer's disease using multimodal data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2022;20:5296-308. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.08.007>.
126. Kononikhin AS, Zakharova NV, Semenov SD, Bugrova AE, Brzhozovskiy AG, Indeykina MI, et al. Prognosis of Alzheimer's Disease Using Quantitative Mass Spectrometry of Human Blood Plasma Proteins and Machine Learning. *Int J Mol Sci*. 2022;23(14). <https://doi.org/10.3390/ijms23147907>.
127. Kruczyk M, Zetterberg H, Hansson O, Rolstad S, Minthon L, Wallin A, et al. Monte Carlo feature selection and rule-based models to predict Alzheimer's disease in mild cognitive impairment. *J Neural Transm (Vienna)*. 2012;119(7):821-31. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0812-0>.
128. Li WW, Wang Z, Fan DY, Shen YY, Chen DW, Li HY, et al. Association of Polygenic Risk Score with Age at Onset and Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Alzheimer's Disease in a Chinese Cohort. *Neurosci Bull*. 2020;36(7):696-704. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00469-8>.
129. Liu K, Chen K, Yao L, Guo X. Prediction of mild cognitive impairment conversion using a combination of independent component analysis and the cox model. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2017;11. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00033>.
130. López ME, Turrero A, Cuesta P, López-Sanz D, Bruña R, Marcos A, et al. Searching for Primary Predictors of Conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease: A Multivariate Follow-Up Study. *J Alzheimers Dis*. 2016;52(1):133-43. <https://doi.org/10.3233/jad-151034>.
131. Luk CC, Ishaque A, Khan M, Ta D, Chenji S, Yang YH, et al. Alzheimer's disease: 3-Dimensional MRI texture for prediction of conversion from mild cognitive impairment. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*. 2018;10:755-63. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2018.09.002>.

132. Lutz MW, Sundseth SS, Burns DK, Saunders AM, Hayden KM, Burke JR, et al. A genetics-based biomarker risk algorithm for predicting risk of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*. 2016;2(1):30-44.
<https://doi.org/10.1016/j.trci.2015.12.002>.
133. Mahzarnia A, Stout JA, Anderson RJ, Moon HS, Han ZY, Beck K, et al. Identifying vulnerable brain networks associated with Alzheimer's disease risk. *Cereb Cortex*. 2022.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhac419>.
134. Nazeri A, Ganjgahi H, Roostaei T, Nichols T, Zarei M, Alzheimers Dis Neuroimaging I. Imaging proteomics for diagnosis, monitoring and prediction of Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2014;102:657-65.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.08.041>.
135. Ning KD, Chen B, Sun FZ, Hobel Z, Zhao L, Matloff W, et al. Classifying Alzheimer's disease with brain imaging and genetic data using a neural network framework. *Neurobiol Aging*. 2018;68:151-8.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.04.009>.
136. Ottoy J, Niemantsverdriet E, Verhaeghe J, De Roeck E, Struyfs H, Somers C, et al. Association of short-term cognitive decline and MCI-to-AD dementia conversion with CSF, MRI, amyloid- and F-18-FDG-PET imaging. *Neuroimage Clin*. 2019;22.
<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.101771>.
137. Padmanabhan K, Nudelman K, Harenberg S, Bello G, Sohn D, Shpanskaya K, et al. Characterizing Gene and Protein Crosstalks in Subjects at Risk of Developing Alzheimer's Disease: A New Computational Approach. *Processes*. 2017;5(3). <https://doi.org/10.3390/pr5030047>.
138. Panayides AS, Pattichis MS, Leandrou S, Pitris C, Constantinidou A, Pattichis CS. Radiogenomics for Precision Medicine With a Big Data Analytics Perspective. *IEEE J Biomed Health Inform*. 2019;23(5):2063-79. <https://doi.org/10.1109/JBHI.2018.2879381>.
139. Perkovic MN, Pivac N. Genetic Markers of Alzheimer's Disease. En: Kim YK, editor. *Frontieres in psychiatry: artificial intelligence, precision medicine, and other paradigms shifts*. 11922019. p. 27-52.
https://doi.org/10.1007/978-981-32-9721-0_3
140. Petrelis AM, Stathopoulou MG, Kafyra M, Murray H, Masson C, Lamont J, et al. VEGF-A-related genetic variants protect against Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)*. 2022;14(6):2524-36.
<https://doi.org/10.18632/aging.203984>.

141. Piccirella S, Van Neste L, Fowler C, Masters CL, Fripp J, Doecke JD, et al. A Conformational Variant of p53 (U-p53(AZ)) as Blood-Based Biomarker for the Prediction of the Onset of Symptomatic Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis.* 2022. <https://doi.org/10.14283/jpad.2022.52>.
142. Planche V, Coupe P, Helmer C, Le Goff M, Amieva H, Tison F, et al. Evolution of brain atrophy subtypes during aging predicts long-term cognitive decline and future Alzheimer's clinical syndrome. *Neurobiol Aging.* 2019;79:22-9. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.03.006>.
143. Reitz C. Novel susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Future Neurology.* 2015;10(6):547-58. <https://doi.org/10.2217/fnl.15.42>.
144. Reitz C. Genetic diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(3):339-48. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1002469>.
145. Roe CM, Fagan AM, Williams MM, Ghoshal N, Aeschleman M, Grant EA, et al. Improving CSF biomarker accuracy in predicting prevalent and incident Alzheimer disease. *Neurology.* 2011;76(6):501-10. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820af900>.
146. Rowe CC, Bourgeat P, Ellis KA, Brown B, Lim YY, Mulligan R, et al. Predicting Alzheimer Disease with beta-Amyloid Imaging: Results from the Australian Imaging, Biomarkers, and Lifestyle Study of Ageing. *Ann Neurol.* 2013;74(6):905-13. <https://doi.org/10.1002/ana.24040>.
147. Russo MJ, Campos J, Vázquez S, Sevlever G, Allegri RF. Adding recognition discriminability index to the delayed recall is useful to predict conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease in the alzheimer's disease neuroimaging initiative. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2017;9. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00046>.
148. Sato K, Mano T, Ihara R, Suzuki K, Niimi Y, Toda T, et al. Cohort-Specific Optimization of Models Predicting Preclinical Alzheimer's Disease, to Enhance Screening Performance in the Middle of Preclinical Alzheimer's Disease Clinical Studies. *J Prev Alzheimers Dis.* 2021;8(4):503-12. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.39>.
149. Sato K, Mano T, Suzuki K, Toda T, Iwatsubo T, Iwata A. Attempt to Predict A/T/N-Based Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid Biomarkers Using a Peripheral Blood DNA Methylation Clock. *Journal of Alzheimer's Disease Reports.* 2020;4(1):287-96. <https://doi.org/10.3233/ADR-200205>.

150. Shaffer JL, Petrella JR, Sheldon FC, Choudhury KR, Calhoun VD, Coleman RE, et al. Predicting Cognitive Decline in Subjects at Risk for Alzheimer Disease by Using Combined Cerebrospinal Fluid, MR Imaging, and PET Biomarkers. *Radiology*. 2013;266(2):583-91. <https://doi.org/10.1148/radiol.12120010>.
151. Shu ZY, Mao DW, Xu YY, Shao Y, Pang PP, Gong XY. Prediction of the progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease using a radiomics-integrated model. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 2021;14. <https://doi.org/10.1177/17562864211029551>.
152. Spasov S, Passamonti L, Duggento A, Lio P, Toschi N, Alzheimers Dis Neuroimaging I. A parameter-efficient deep learning approach to predict conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2019;189:276-87. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.01.031>.
153. Steenland K, Zhao LP, Goldstein F, Cellar J, Lah J, Alzheimer's Dis Neuroimaging I. Biomarkers for Predicting Cognitive Decline in those with Normal Cognition. *J Alzheimers Dis*. 2014;40(3):587-94. <https://doi.org/10.3233/JAD-2014-131343>.
154. Steenland K, Zhao L, John SE, Goldstein FC, Levey A, Alvaro A. A 'Framingham-like' Algorithm for Predicting 4-Year Risk of Progression to Amnesic Mild Cognitive Impairment or Alzheimer's Disease Using Multidomain Information. *J Alzheimers Dis*. 2018;63(4):1383-93. <https://doi.org/10.3233/jad-170769>.
155. Stephan BCM, Kurth T, Matthews FE, Brayne C, Dufouil C. Dementia risk prediction in the population: are screening models accurate? *Nat Rev Neurol*. 2010;6(6):318-26. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.54>.
156. Tabaton M, Odetti P, Cammarata S, Borghi R, Monacelli F, Caltagirone C, et al. Artificial Neural Networks Identify the Predictive Values of Risk Factors on the Conversion of Amnesic Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(3):1035-40. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1300>.
157. Tierney MC, Szalai JP, Snow WG, Fisher RH, Tsuda T, Chi H, et al. A prospective study of the clinical utility of ApoE genotype in the prediction of outcome in patients with memory impairment. *Neurology*. 1996;46(1):149-54. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.1.149>.
158. Tosto G, Reitz C. Genomics of Alzheimer's disease: Value of high-throughput genomic technologies to dissect its etiology. *Mol Cell Probes*. 2016;30(6):397-403. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.09.001>.

159. Trzepacz PT, Yu P, Sun J, Schuh K, Case M, Witte MM, et al. Comparison of neuroimaging modalities for the prediction of conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's dementia. *Neurobiol Aging*. 2014;35(1):143-51. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.018>.
160. van Rossum IA, Visser PJ, Knol DL, van der Flier WM, Teunissen CE, Barkhof F, et al. Injury Markers but not Amyloid Markers are Associated with Rapid Progression from Mild Cognitive Impairment to Dementia in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;29(2):319-27. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111694>.
161. Velez JI, Lopera F, Creagh PK, Pineros LB, Das D, Cervantes-Henriquez ML, et al. Targeting Neuroplasticity, Cardiovascular, and Cognitive-Associated Genomic Variants in Familial Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2019;56(5):3235-43. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1298-z>.
162. Venkatraghavan V, Vinke EJ, Bron EE, Niessen WJ, Ikram MA, Klein S, et al. Progression along data-driven disease timelines is predictive of Alzheimer's disease in a population-based cohort. *Neuroimage* 2021;238. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.118233>.
163. Wang PN, Lirng JF, Lin KN, Chang FC, Liu HC. Prediction of Alzheimer's disease in mild cognitive impairment: A prospective study in Taiwan. *Neurobiol Aging*. 2006;27(12):1797-806. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.10.002>.
164. Ye JP, Farnum M, Yang E, Verbeeck R, Lobanov V, Raghavan N, et al. Sparse learning and stability selection for predicting MCI to AD conversion using baseline ADNI data. *BMC Neurol*. 2012;12. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-12-46>.
165. You J, Zhang YR, Wang HF, Yang M, Feng JF, Yu JT, et al. Development of a novel dementia risk prediction model in the general population: A large, longitudinal, population-based machine-learning study. *eClinicalMedicine*. 2022;53. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101665>.
166. Zhang C, Hu R, Zhang G, Zhe Y, Hu B, He J, et al. A Weighted Genetic Risk Score Based on Four APOE-Independent Alzheimer's Disease Risk Loci May Supplement APOE E4 for Better Disease Prediction. *Journal of molecular neuroscience*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01372-2>.
167. Zhao X, Sui H, Yan C, Zhang M, Song H, Liu X, et al. Machine-Based Learning Shifting to Prediction Model of Deteriorative MCI Due to

Alzheimer's Disease - A Two-Year Follow-Up Investigation. *Curr Alzheimer Res.* 2022;19(10):708-15.
<https://doi.org/10.2174/1567205020666221019122049>.

168. Zhu JD, Huang CW, Chang HI, Tsai SJ, Huang SH, Hsu SW, et al. Functional MRI and ApoE4 genotype for predicting cognitive decline in amyloid-positive individuals. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders.* 2022;15. <https://doi.org/10.1177/17562864221138154>.
169. Moons KG, Altman DG, Reitsma JB, Ioannidis JP, Macaskill P, Steyerberg EW, et al. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis (TRIPOD): explanation and elaboration. *Ann Intern Med.* 2015;162(1):W1-73.
<https://doi.org/10.7326/m14-0698>.

Anexos

Anexo 1: Clasificación de las dislipemias según fenotipo lipídico (Clasificación de Fredrickson)

| LUJO | LIPOPROTEINA AUMENTADA | LÍPIDOS AUMENTADOS |
|------|------------------------|--------------------|
| I | CM | TG |
| IIa | LDL | Colesterol |
| IIb | LDL y VLDL | TG y colesterol |
| III | VLDL y residuos de QM | TG y colesterol |
| IV | VLDL | TG |
| V | QM y VLDL | TG y colesterol |

LDL: Lipoproteínas de baja densidad (*Very low density lipoprotein*). **CM:** Quilomicrones. **TG:** Triglicéridos.
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad (*Very low density lipoprotein*).

Fuente: Miguel Soca et al. 2009⁶⁷.

Anexo 2: Clasificación de las dislipemias primarias según etiología

| ENTIDAD | DEFECTO | HERENCIA | PREVALENCIA | LÍPIDOS |
|--|--|-------------|--|-----------------------|
| Hipercolesterolemia familiar monogénica | Receptor LDL | AD | Heterocigoto 1-2/1.000 Homocigoto 1/10 ⁶ | CT, LDLc |
| Hipercolesterolemia poligénica | Desconocido | Poligénica | 2-5/100 | CT, LDLc |
| Déficit de apo-B100 | apoB-100 | AD | 1/700-1.000 | CT, LDLc |
| Hiperlipemia familiar | Desconocido | AD | Heterocigoto 1/1.000 Homocigoto 3-5/1.000 | CT, LDLc, ↑ de apoB |
| Hipertrigliceridemia familiar | Déficit de lipoproteín-lipasa, déficit de ApoCII, otros mecanismos | Desconocido | Heterocigoto 1/100 Homocigoto 2/1.000 | TG, VLDLc, LDLc, HDLc |
| Disbetalipoproteinemia familiar | apoE | AR | 1/2.000 | CT, TG |
| Hipoalfalipoproteinemia familiar | apoAI | AD, AR | | HDLc ↓ |

AD: autosómica dominante. **apoAI:** apolipoproteína AI. **apoB:** apolipoproteína B. **apoCII:** apolipoproteína CII. **apoE:** apolipoproteína E. **AR:** autosómica recesiva. **CT:** colesterol total. **HDLc:** colesterol tipo HDL (lipoproteínas de alta densidad). **TG:** triglicéridos. **LDLc:** colesterol de tipo LDL (lipoproteínas de baja densidad). **VLDLc:** colesterol de tipo VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad).

Fuente: Muñoz et al. 2015⁶⁸

Anexo 3: Estrategia de búsqueda bibliográfica

Estrategia de búsqueda para DBLP:

Pubmed

#1 “Hyperlipoproteinemia Type III”[Mesh] OR (familial[tiab] dysbetalipoproteinemia[tiab]) OR (hyperlipoproteinemia[tiab]) OR (palmar[tiab] xanthomas[tiab]) OR (hyperlipidemia[tiab])

#2 “Apolipoproteins E”[Mesh] OR (gen[tiab] ApoE[tiab]) OR (apoE[tiab] gene[tiab]) OR (apolipoprotein[tiab] E[tiab] gene[tiab]) OR (gene[tiab] apolipoprotein[tiab] E[tiab]) OR (ApoE[tiab] genotype[tiab]) OR (ApoE[tiab] genotypes[tiab])

#3 “Diagnosis”[Mesh] OR “diagnosis”[Subheading] OR diagnosis[tiab] OR diagnostic[tiab] OR diagnoses[tiab] OR diagnose[tiab]

#1 AND #2 AND #3

Embase

#1 ‘familial dysbetalipoproteinemia’/exp OR ‘hyperlipoproteinemia type 3’/exp

#2 (familial dysbetalipoproteinemia):ab,ti OR hyperlipoproteinemia:ab,ti OR (palmar xanthomas):ab,ti OR hyperlipidemia:ab,ti

#3 ‘apolipoprotein e gene’/exp

#4 (gen ApoE):ab,ti OR (apoE gene):ab,ti OR (apolipoprotein E gene):ab,ti OR (gene apolipoprotein E):ab,ti OR (ApoE genotype):ab,ti OR (ApoE genotypes):ab,ti

#5 ‘diagnosis’/exp

#6 (diagnosis OR diagnostic OR diagnoses OR diagnose):ab,ti

(#1 OR #2) AND (#3 OR #4) AND (#5 OR #6)

Cochrane

#1 ((familial dysbetalipoproteinemia) OR hyperlipoproteinemia OR (palmar xanthomas) OR hyperlipidemia):ti,ab,kw (Word variations have been searched)

#2 ((gen ApoE) OR (apoE gene) OR (apolipoprotein E gene) OR (gene apolipoprotein E) OR (ApoE genotype) OR (ApoE genotypes)):ti,ab,kw (Word variations have been searched)

#3 (diagnosis OR diagnostic OR diagnoses OR diagnose):ti,ab,kw (Word variations have been searched)

#4 #1 AND #2 AND #3

Web of Science

((TS=("familial dysbetalipoproteinemia" OR hyperlipoproteinemia OR "palmar xanthomas" OR hyperlipidemia)) AND TS=("gen ApoE" OR "apoE gene" OR "apolipoprotein E gene" OR "gene apolipoprotein E" OR "ApoE genotype" OR "ApoE genotypes")) AND TS=(diagnosis OR diagnostic OR diagnoses OR diagnose)

HTA

((familial dysbetalipoproteinemia) OR hyperlipoproteinemia OR (palmar xanthomas) OR hyperlipidemia) AND ((gen ApoE) OR (apoE gene) OR (apolipoprotein E gene) OR (gene apolipoprotein E) OR (ApoE genotype) OR (ApoE genotypes)) AND (diagnosis OR diagnostic OR diagnoses OR diagnose)

REGISTROS DE ENSAYOS CLÍNICOS:

ClinicalTrial.gov

"gen ApoE" OR "apoE gene" OR "apolipoprotein E gene" OR "gene apolipoprotein E" OR "ApoE genotype" OR "ApoE genotypes" | Studies With Results | "familial dysbetalipoproteinemia" OR hyperlipoproteinemia OR "palmar xanthomas" OR hyperlipidemia

International Clinical Trials Registry Platform (WHO)

("familial dysbetalipoproteinemia" OR hyperlipoproteinemia OR "palmar xanthomas" OR hyperlipidemia) AND ("gen ApoE" OR "apoE gene" OR "apolipoprotein E gene" OR "gene apolipoprotein E" OR "ApoE genotype" OR "ApoE genotypes")

EU Clinical Trials Register

((familial dysbetalipoproteinemia) OR hyperlipoproteinemia OR (palmar xanthomas) OR hyperlipidemia) AND ((gen ApoE) OR (apoE gene) OR

(apolipoprotein E gene) OR (gene apolipoprotein E) OR (ApoE genotype)
OR (ApoE genotypes))

ISRCTN registry

((familial dysbetalipoproteinemia) OR hyperlipoproteinemia OR (palmar
xanthomas) OR hyperlipidemia) AND ((gen ApoE) OR (apoE gene) OR
(apolipoprotein E gene) OR (gene apolipoprotein E) OR (ApoE genotype)
OR (ApoE genotypes))

Estrategia de búsqueda para EA:

En el caso de las búsquedas para Enfermedad de Alzheimer se llevaron a
cabo dos estrategias de búsqueda diferentes con el fin de ampliar más de
posibilidades de recuperación de información.

➤ 1ª estrategia de búsqueda:

Pubmed

#1 “Alzheimer Disease”[Mesh] OR (Alzheimer’s[tiab] disease*[tiab]) OR
(Alzheimer[tiab] disease*[tiab])

#2 “Apolipoproteins E”[Mesh] OR ApoE*[tiab] OR (apolipo-
protein*[tiab] E*[tiab])

#3 “Real-Time Polymerase Chain Reaction”[Mesh] OR
(quantitative[tiab] PCR[tiab]) OR qPCR[tiab] OR (quantitative[tiab]
real[tiab] time[tiab] PCR[tiab]) OR (quantitative[tiab] real-time[tiab]
PCR[tiab]) OR (quantitative[tiab] polymerase[tiab] chain[tiab]
reaction[tiab]) OR (quantitative[tiab] real-time[tiab] polymerase[tiab]
chain[tiab] reaction[tiab]) OR (quantitative[tiab] real[tiab] time[tiab]
polymerase[tiab] chain[tiab] reaction[tiab]) OR (qRT-PCR[tiab]
real[tiab] time[tiab]) OR (qRTPCR[tiab] real[tiab] time[tiab]) OR
RTqPCR[tiab] OR RTQ-PCR[tiab] or RT-qPCR[tiab] OR (RT[tiab]
PCR[tiab]) OR (real[tiab] time[tiab] PCR[tiab]) OR (real-time[tiab]
PCR[tiab]) OR (real[tiab] time[tiab] polymerase[tiab] chain[tiab]
reaction[tiab]) OR (real-time[tiab] polymerase[tiab] chain[tiab]
reaction[tiab]) OR (real[tiab] time[tiab] quantitative[tiab] polyme-
rase[tiab]) OR (realtime[tiab] quantitative[tiab] polymerase[tiab]
chain[tiab] reaction[tiab])

#1 AND #2 AND #3

Embase

#1 'Alzheimer disease'/exp

#2 (Alzheimer* disease*):ab,ti

#3 'apolipoprotein e gene'/exp

#4 apoe*:ab,ti OR (apolipoprotein*:ab,ti AND e*:ab,ti)

#5 'real time polymerase chain reaction'/exp

#6 (quantitative PCR):ab,ti OR qPCR:ab,ti OR (quantitative real time PCR):ab,ti OR (quantitative real-time PCR):ab,ti OR (quantitative polymerase chain reaction):ab,ti OR (quantitative real-time polymerase chain reaction):ab,ti OR (quantitative real time polymerase chain reaction):ab,ti OR (qRT-PCR real time):ab,ti OR (qRTPCR real time):ab,ti OR RTqPCR:ab,ti OR RTQ-PCR:ab,ti or RT-qPCR:ab,ti OR (RT PCR):ab,ti OR (real time PCR):ab,ti OR (real-time PCR):ab,ti OR (real time polymerase chain reaction):ab,ti OR (real-time polymerase chain reaction):ab,ti OR (real time quantitative polymerase):ab,ti OR (realtime quantitative polymerase chain reaction):ab,ti

(#1 OR #2) AND (#3 OR #4) AND (#5 OR #6)

Cochrane

#1 ((Alzheimer* disease*)):ti,ab,kw (Word variations have been searched)

#2 (apoe* OR (apolipoprotein* AND e*)):ti,ab,kw (Word variations have been searched)

#3 ((quantitative PCR) OR qPCR OR (quantitative real time PCR) OR (quantitative real-time PCR) OR (quantitative polymerase chain reaction) OR (quantitative real-time polymerase chain reaction) OR (quantitative real time polymerase chain reaction) OR (qRT-PCR real time) OR (qRTPCR real time) OR RTqPCR OR RTQ-PCR or RT-qPCR OR (RT PCR) OR (real time PCR) OR (real-time PCR) OR (real time polymerase chain reaction) OR (real-time polymerase chain reaction) OR (real time quantitative polymerase) OR (realtime quantitative polymerase chain reaction)):ti,ab,kw (Word variations have been searched)

#1 AND #2 AND #3

Web of Science

((TS=((Alzheimer* disease*))) AND TS=(apoe* OR (apolipoprotein* AND e))) AND TS=((quantitative PCR) OR qPCR OR (quantitative real

time PCR) OR (quantitative real-time PCR) OR (quantitative polymerase chain reaction) OR (quantitative real-time polymerase chain reaction) OR (quantitative real time polymerase chain reaction) OR (qRT-PCR real time) OR (qRTPCR real time) OR RTqPCR OR RTQ-PCR or RT-qPCR OR (RT PCR) OR (real time PCR) OR (real-time PCR) OR (real time polymerase chain reaction) OR (real-time polymerase chain reaction) OR (real time quantitative polymerase) OR (realtime quantitative polymerase chain reaction)) and Article or Early Access or Review Article (Document Types)

HTA

((Alzheimer* disease*)) AND (apoe* OR (apolipoprotein* AND e*))

REGISTROS DE ENSAYOS CLÍNICOS:

ClinicalTrial.gov

“gen ApoE” OR “apoE gene” OR “apolipoprotein E gene” OR “gene apolipoprotein E” OR “ApoE genotype” OR “ApoE genotypes” | Studies With Results | “Alzheimer’s disease” OR “Alzheimer disease”

International Clinical Trials Registry Platform (WHO)

(“Alzheimer’s disease” OR “Alzheimer disease”) AND (“gen ApoE” OR “apoE gene” OR “apolipoprotein E gene” OR “gene apolipoprotein E” OR “ApoE genotype” OR “ApoE genotypes”)

EU Clinical Trials Register

((Alzheimer* disease*)) AND ((gen ApoE) OR (apoE gene) OR (apolipoprotein E gene) OR (gene apolipoprotein E) OR (ApoE genotype) OR (ApoE genotypes))

ISRCTN registry

((Alzheimer* disease*)) AND ((gen ApoE) OR (apoE gene) OR (apolipoprotein E gene) OR (gene apolipoprotein E) OR (ApoE genotype) OR (ApoE genotypes))

➤ 2ª estrategia de búsqueda para EA:

Pubmed

#1 “Alzheimer Disease”[Mesh] OR (Alzheimer’s[tiab] disease*[tiab]) OR (Alzheimer[tiab] disease*[tiab])

#2 “Apolipoproteins E”[Mesh] OR ApoE*[tiab] OR (apolipoprotein*[tiab] E[tiab])

#3 “prognostic prediction model”[tiab] OR “prognostic model”[tiab] OR “prediction model”[tiab] OR prognoses[tiab] OR “prognostic factors”[tiab] OR “prognostic factor”[tiab] OR “forecast model”[tiab] OR “forecast modeling”[tiab] OR “forecast modelling”[tiab] OR “forecast simulation”[tiab] OR “forecasting model”[tiab] OR “predictive modeling”[tiab] OR “predictive modelling”[tiab] OR “predictive simulation”[tiab] OR “predictive model”[tiab]

#1 AND #2 AND #3

Embase

#1 ‘Alzheimer disease’/exp

#2 (Alzheimer* disease*):ab,ti

#3 ‘apolipoprotein e gene’/exp

#4 apoe*:ab,ti OR (apolipoprotein*:ab,ti AND e:ab,ti)

#5 ‘predictive model’/exp

#6 (prognostic prediction model):ab,ti OR (prognostic model):ab,ti OR (prediction model):ab,ti OR prognoses OR (prognostic factors):ab,ti OR (prognostic factor):ab,ti OR (forecast model):ab,ti OR (forecast modeling):ab,ti OR (forecast modelling):ab,ti OR (forecast simulation):ab,ti OR (forecasting model):ab,ti OR (predictive modeling):ab,ti OR (predictive modelling):ab,ti OR (predictive simulation):ab,ti OR (predictive model):ab,ti

(#1 OR #2) AND (#3 OR #4) AND (#5 OR #6)

Cochrane

#1 (((Alzheimer* disease*)):ti,ab,kw (Word variations have been searched)

#2 ((apoe* OR (apolipoprotein* AND e*)):ti,ab,kw (Word variations have been searched)

#3 (“prognostic prediction model” OR “prognostic model” OR “prediction model” OR prognoses OR “prognostic factors” OR “prognostic factor” OR “forecast model” OR “forecast modeling” OR “forecast modelling” OR “forecast simulation” OR “forecasting model” OR “predictive

modeling” OR “predictive modelling” OR “predictive simulation” OR “predictive model”):ti,ab,kw (Word variations have been searched)

#4 #1 AND #2 AND #3

Web of Science

((TS=((Alzheimer* disease*))) AND TS=(apoe* OR (apolipoprotein* AND e))) AND TS=(“prognostic prediction model” OR “prognostic model” OR “prediction model” OR prognoses OR “prognostic factors” OR “prognostic factor” OR “forecast model” OR “forecast modeling” OR “forecast modelling” OR “forecast simulation” OR “forecasting model” OR “predictive modeling” OR “predictive modelling” OR “predictive simulation” OR “predictive model”) and Article or Review Article (Document Types) and English or French or Spanish (Languages)

HTA

((Alzheimer* disease*)) AND (apoe* OR (apolipoprotein* AND e*))

REGISTROS DE ENSAYOS CLÍNICOS:

ClinicalTrial.gov

“gen ApoE” OR “apoE gene” OR “apolipoprotein E gene” OR “gene apolipoprotein E” OR “ApoE genotype” OR “ApoE genotypes” | Studies With Results | “Alzheimer’s disease” OR “Alzheimer disease”

International Clinical Trials Registry Platform (WHO)

(“Alzheimer’s disease” OR “Alzheimer disease”) AND (“gen ApoE” OR “apoE gene” OR “apolipoprotein E gene” OR “gene apolipoprotein E” OR “ApoE genotype” OR “ApoE genotypes”)

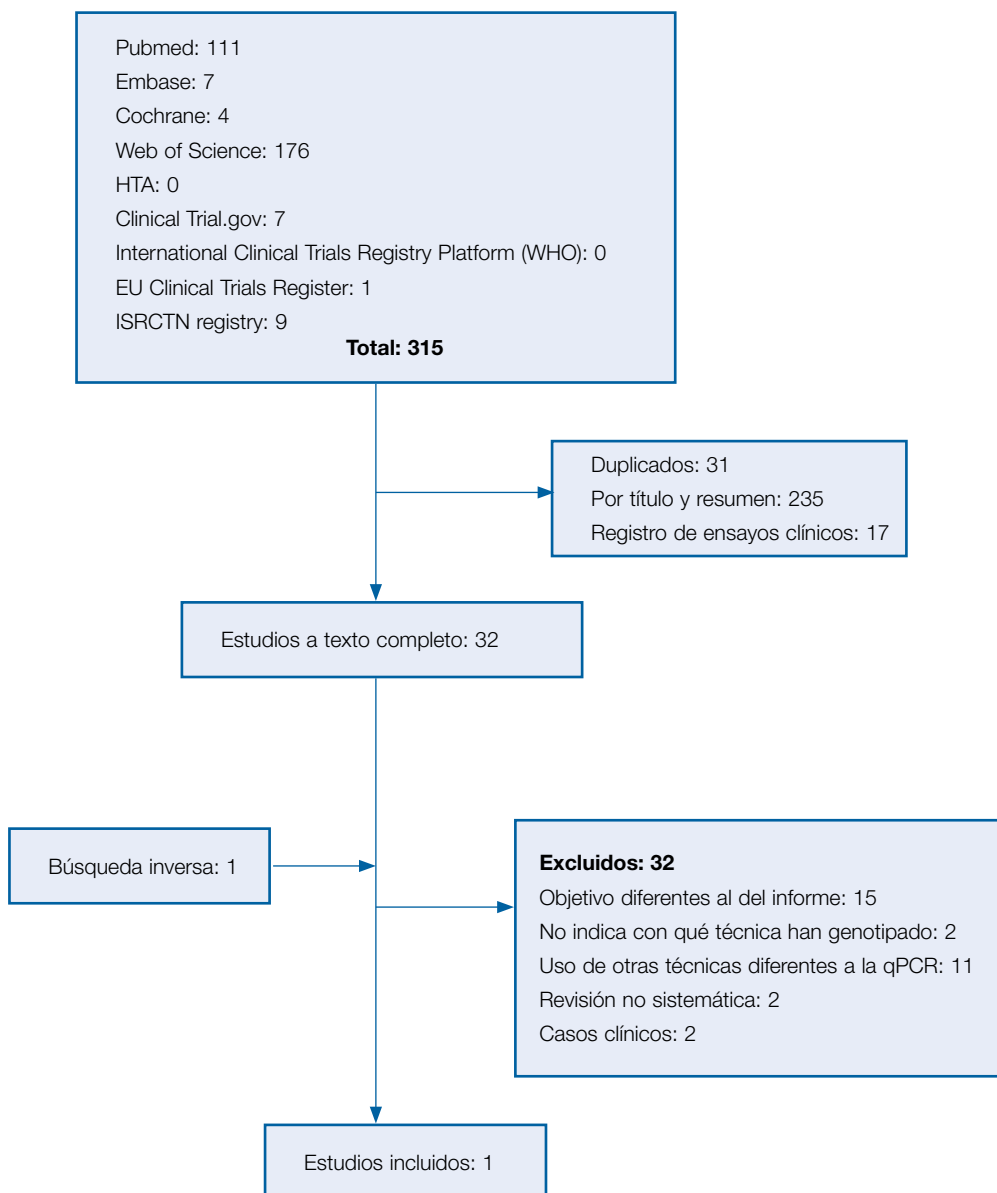
EU Clinical Trials Register

((Alzheimer* disease*)) AND ((gen ApoE) OR (apoE gene) OR (apolipoprotein E gene) OR (gene apolipoprotein E) OR (ApoE genotype) OR (ApoE genotypes))

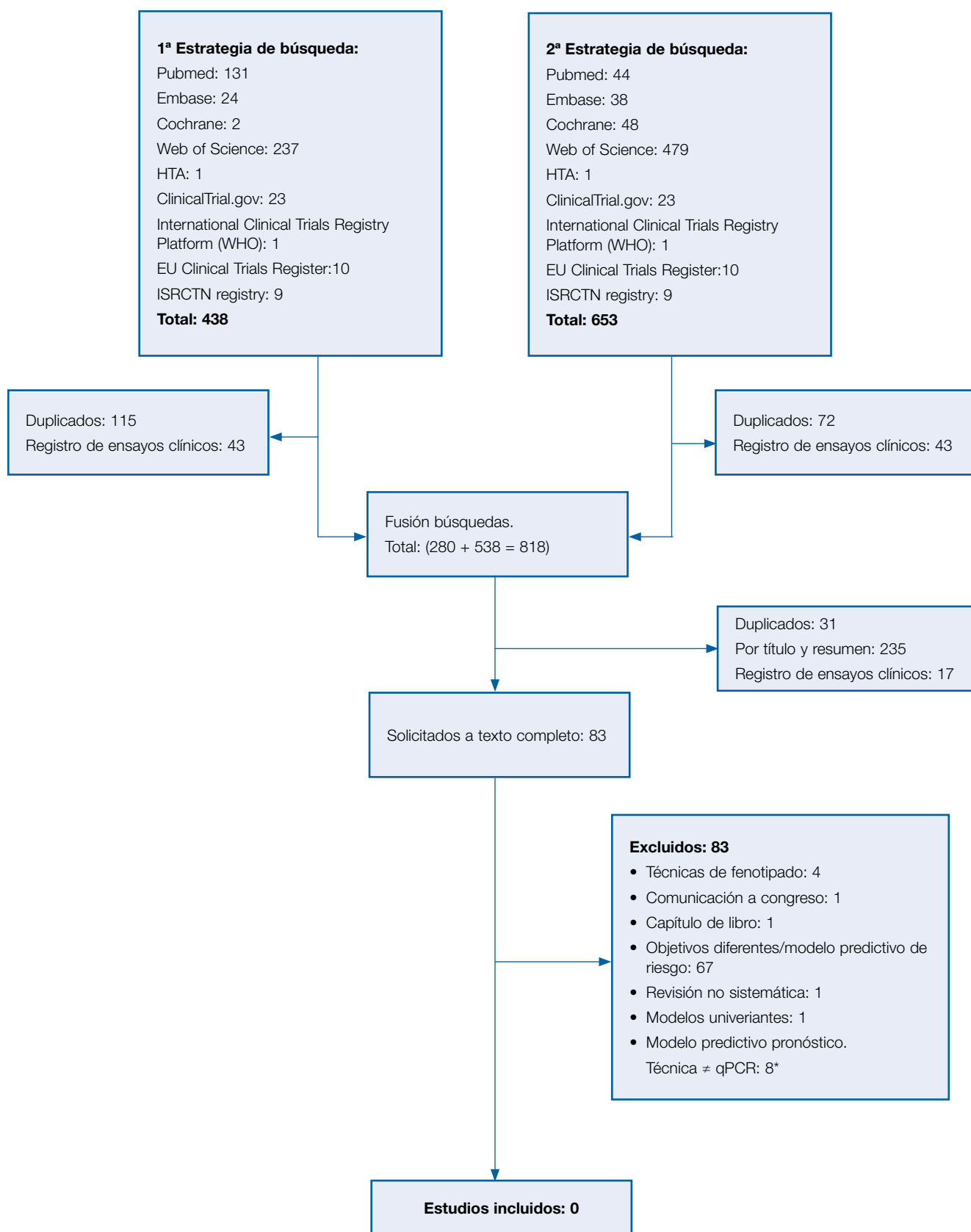
ISRCTN registry

((Alzheimer* disease*)) AND ((gen ApoE) OR (apoE gene) OR (apolipoprotein E gene) OR

Anexo 4: Diagrama de flujo. Genotipado de *apoE* por qPCR en el diagnóstico de la DBLP



Anexo 5: Diagrama de flujo. Genotipado de *apoE* por qPCR en modelos predictivos pronóstico de EA de inicio tardío



* De acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión descritos en el presente informe en el apartado de Metodología, aquellos modelos predictivos pronóstico para EA de inicio tardío donde se incluyan técnicas genéticas diferentes a la qPCR para el genotipado de *apoE*; fueron recopilados en una tabla que incluyera sus principales características.

Anexo 6: Estudios excluidos y motivo de exclusión: DBLP

| ESTUDIO | | MOTIVO DE EXCLUSIÓN |
|---------|-------------------------------------|---|
| 1 | Abou et al. 2021 ⁶⁹ | Objetivo diferente al del informe |
| 2 | Ahmed et al. 2017 ⁷⁰ | No indica técnica de genotipado |
| 3 | Berberich et al. 2019 ⁷¹ | Objetivo diferente al del informe |
| 4 | Blom et al. 2002 ⁷² | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 5 | Boot et al. 2020 | Objetivo diferente al del informe |
| 6 | Cenarro et al. 2021 ²⁰ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 7 | Corsetti et al. 2018 ⁷³ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 8 | Cortés et al. 2009 ⁷⁴ | Caso clínico |
| 9 | Evans et al. 2005 ⁷⁵ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 10 | Ferreira et al. 2010 ⁷⁶ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 11 | Hameed et al. 2022 ⁷⁷ | Objetivo diferente al del informe |
| 12 | Heidemann et al. 2022 ²¹ | Objetivo diferente al del informe |
| 13 | Heidemann et al. 2021 ⁷⁸ | Objetivo diferente al del informe |
| 14 | Johansen et al. 2011 ⁷⁹ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 15 | Judson et al. 2004 ⁸⁰ | Objetivo diferente al del informe |
| 16 | Koopal et al. 2017 ⁵² | Revisión no sistemática |
| 17 | Koopal et al. 2015 ⁸¹ | Objetivo diferente al del informe |
| 18 | Lazzareti et al. 2013 ⁸² | Objetivo diferente al del informe |
| 19 | Limonova et al. 2021 ⁸³ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 20 | Marais et al. 2014 ⁸⁴ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 21 | Marais et al. 2015 ⁸⁵ | No se indica técnica de genotipado |
| 22 | Paquette et al. 2022 ⁸⁶ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 23 | Paquette et al. 2020 ³ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 24 | Paquette et al. 2022 ⁸⁷ | Revisión no sistemática |
| 25 | Pieri et al. 2023 ⁸⁸ | Objetivo diferente al del informe |

| ESTUDIO | | MOTIVO DE EXCLUSIÓN |
|---------|---|---|
| 26 | Sinnott et al. 2006 ⁸⁹ | Caso clínico |
| 27 | Smelt et al. 2004 ⁹⁰ | Objetivo diferente al del informe |
| 28 | Solanas-Barca et al. 2012 ⁹¹ | Uso de otras técnicas diferentes a la qPCR para el genotipado |
| 29 | Torres et al. 2009 ⁹² | Objetivo diferente al del informe |
| 30 | Torres et al. 2016 ⁹³ | Objetivo diferente al del informe |
| 31 | Villeneuve et al. 2014 ¹⁷ | Objetivo diferente al del informe |
| 32 | Wierzbicki et al. 2022 ⁹⁴ | Objetivo diferente al del informe |

Anexo 7: Estudios excluidos y motivo de exclusión: EA de inicio tardío

| ESTUDIO | | MOTIVO DE EXCLUSIÓN |
|---------|---|--|
| 1 | Abdullah et al. 2009 ⁶ | Modelo predictivo pronóstico. No usan qPCR (tabla recopilatoria) |
| 2 | Aguilar et al. 2014 ⁹⁵ | Objetivos diferentes al informe |
| 3 | Altmann et al. 2020 ⁹⁶ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 4 | Ampuero et al. 2008 ⁹⁷ | Objetivos diferentes al informe |
| 5 | Arbeev et al. 2023 ⁹⁸ | Objetivos diferentes al informe |
| 6 | Arbizu et al. 2013 ⁹⁹ | Modelo predictivo de riesgo |
| 7 | Bertens et al. 2017 ¹⁰⁰ | Objetivos diferentes al informe |
| 8 | Blazhenets et al. 2020 ¹⁰¹ | Objetivos diferentes al informe |
| 9 | Blenkinsop et al. 2020 ¹⁰² | Objetivos diferentes al informe |
| 10 | Brookes et al. 2005 ¹⁰³ | Objetivos diferentes al informe |
| 11 | Callahan et al. 2015 ¹⁰⁴ | Objetivos diferentes al informe |
| 12 | Chen et al. 2022 ¹⁰⁵ | Objetivos diferentes al informe |
| 13 | Chen et al. 2023 ¹⁰⁶ | Objetivos diferentes al informe |
| 14 | Chiba Falek et al. 2017 ¹⁰⁷ | Objetivos diferentes al informe |
| 15 | Choo et al. 2013 ¹⁰⁸ | Objetivos diferentes al informe |
| 16 | Dang et al. 2018 ¹⁰⁹ | Objetivos diferentes al informe |
| 17 | Davatzikos et al. 2014 | Modelo predictivo pronóstico. No usan qPCR (tabla recopilatoria) |
| 18 | Delvaux et al. 2017 ¹¹⁰ | Modelo predictivo de riesgo |
| 19 | Devanand et al. 2005 ¹¹¹ | Objetivos diferentes al informe |
| 20 | Drzezga et al. 2005 ¹¹² | Objetivos diferentes al informe |
| 21 | Escott-Price et al. 2015 ¹¹³ | Objetivos diferentes al informe |
| 22 | Ezzati et al. 2019 ¹¹⁴ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 23 | Fan et al. 2020 ¹¹⁵ | Revisión no sistemática |
| 24 | Fleisher et al. 2007 ¹¹⁶ | Objetivos diferentes al informe |
| 25 | Fleisher et al. 2008 ¹¹⁷ | Objetivos diferentes al informe |
| 26 | Forlenza et al. 2010 ¹¹⁸ | Modelo predictivo de riesgo |
| 27 | Giorgio et al. 2020 ¹¹⁹ | Modelo predictivo de riesgo |
| 28 | Gomar et al. 2014 ¹²⁰ | Objetivos diferentes al informe |
| 29 | Hane et al. 2018 ¹²¹ | Modelo predictivo de riesgo |
| 30 | Hartz et al. 2023 ^B | Modelo predictivo pronóstico. No usan qPCR (tabla recopilatoria) |

| ESTUDIO | | MOTIVO DE EXCLUSIÓN |
|---------|--|--|
| 31 | Huang et al. 2020 ¹²² | Comunicación a congreso |
| 32 | Jia L. et al. 2021 ¹²³ | Modelo predictivo de riesgo |
| 33 | Kauppi et al. 2018 ¹³ | Modelo predictivo pronóstico. No usan qPCR (tabla recopilatoria) |
| 34 | Khan et al. 2015 ¹²⁴ | Modelo predictivo de riesgo |
| 35 | Kikuchi et al. 2022 ¹²⁵ | Modelo predictivo de riesgo |
| 36 | Kononikhin et al. 2022 ¹²⁶ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 37 | Kruczyk et al. 2012 ¹²⁷ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 38 | Li W. et al. 2020 ¹²⁸ | Modelo predictivo de riesgo |
| 39 | Liu K. et al. 2017 ¹²⁹ | Modelo predictivo de riesgo |
| 40 | López et al. 2016 ¹³⁰ | Modelo predictivo de riesgo |
| 41 | Luk et al. 2018 ¹³¹ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 42 | Lutz et al. 2016 ¹³² | Modelo predictivo riesgo |
| 43 | Mahzarmia et al. 2022 ¹³³ | Objetivos diferentes al informe |
| 44 | Nazeri et al. 2014 ¹³⁴ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 45 | Ning et al. 2018 ¹³⁵ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 46 | Ottoy et al. 2019 ¹³⁶ | Objetivos diferentes al informe |
| 47 | Padmanabhan et al. 2017 ¹³⁷ | Objetivos diferentes al informe |
| 48 | Panayides et al. 2019 ¹³⁸ | Objetivos diferentes al informe |
| 49 | Perkovi et al. 2019 ¹³⁹ | Capítulo de libro |
| 50 | Petrelis et al. 2022 ¹⁴⁰ | Objetivos diferentes al informe |
| 51 | Piccirella et al. 2022 ¹⁴¹ | Identifican por técnicas de fenotipado |
| 52 | Planche et al. 2019 ¹⁴² | Ofrece modelo predictivo univariante |
| 53 | Qiu et al. 2014 ⁹ | Modelo predictivo pronóstico. No usan qPCR (tabla recopilatoria) |
| 54 | Reitz et al. 2015 ¹⁴³ | Objetivos diferentes al informe |
| 55 | Reitz et al. 2015 ¹⁴⁴ | Objetivos diferentes al informe |
| 56 | Roe et al. 2011 ¹⁴⁵ | Objetivos diferentes al informe |
| 57 | Rowe et al. 2013 ¹⁴⁶ | Objetivos diferentes al informe |
| 58 | Russo et al. 2017 ¹⁴⁷ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 59 | Sato et al. 2021 ¹⁴⁸ | Objetivos diferentes al informe |
| 60 | Sato et al. 2020 ¹⁴⁹ | Objetivos diferentes al informe |
| 61 | Shaffer et al. 2013 ¹⁵⁰ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 62 | Shigemizu et al. 2020 ¹⁰ | Modelo predictivo pronóstico. No usan qPCR (tabla recopilatoria) |
| 63 | Shu et al. 2021 ¹⁵¹ | Modelo predictivo de riesgo |

| ESTUDIO | | MOTIVO DE EXCLUSIÓN |
|---------|---|--|
| 64 | Sorensen et al. 2019 ¹¹ | Modelo predictivo pronóstico. No usan qPCR (tabla recopilatoria) |
| 65 | Spasov et al. 2019 ¹⁵² | Modelo predictivo de riesgo |
| 66 | Steeland et al. 2014 ¹⁵³ | Objetivos diferentes al informe |
| 67 | Steeland et al. 2018 ¹⁵⁴ | Objetivos diferentes al informe |
| 68 | Stephan et al. 2010 ¹⁵⁵ | Modelo predictivo de riesgo |
| 69 | Tabatan et al. 2010 ¹⁵⁶ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 70 | Tierney et al. 1996 ¹⁵⁷ | Objetivos diferentes al informe |
| 71 | Tosto et al. 2016 ¹⁵⁸ | Objetivos diferentes al informe |
| 72 | Trzepacz et al. 2014 ¹⁵⁹ | Modelo predictivo diagnóstico |
| 73 | Van Maurik et al. 2019 ¹² | Modelo predictivo pronóstico. No usan qPCR (tabla recopilatoria) |
| 74 | Van Rossum et al. 2012 ¹⁶⁰ | Objetivos diferentes al del informe |
| 75 | Velez et al. 2019 ¹⁶¹ | Objetivos diferentes al informe |
| 76 | Venkatraghavan et al. 2021 ¹⁶² | Modelo predictivo diagnóstico |
| 77 | Villeneuve et al. 2014 ¹⁷ | Objetivos diferentes al informe |
| 78 | Wang et al. 2006 ¹⁶³ | Objetivos diferentes al informe |
| 79 | Ye J. et al. 2012 ¹⁶⁴ | Objetivos diferentes al informe |
| 80 | You J. et al. 2022 ¹⁶⁵ | Modelo predictivo de riesgo |
| 81 | Zhang C. et al. 2019 ¹⁶⁶ | Objetivos diferentes al informe |
| 82 | Zhao X. et al. 2022 ¹⁶⁷ | Objetivos diferentes al informe |
| 83 | Zhu J. et al. 2022 ¹⁶⁸ | Objetivos diferentes al informe |

Anexo 8. Síntesis de la evidencia: Papel del genotipado de *apoE* en el diagnóstico de la DBLP

| CITA ABREVIADA | POBLACIÓN | MÉTODO | RESULTADOS | CONCLUSIONES | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|--------------|----|---------------------|---------------------|----|----|-----------------|-----------------|---------------------|-------|----|-------|-----|---|------------------|-------------------|----------------------|-------|----|-----|-----|---|--------------------|--------------------|---------------------|-------|----|-----|-------|---|-----------------|---------------------|-----------------|-------|----|-------|-----|---|------------------|---------------------|--------------------|-------|----|-------|----|----|---------------------|---------------------|--------------------|-------|----|-------|-----|----|---------------------|---------------------|--|
| <p>Bea et al. 2023¹</p> <p>Objetivos: Definir las características de la DBLP basado en el análisis de apoE y proponer un algoritmo diagnóstico para el cribado de la DBLP.</p> <p>Diseño: Observacional retrospectivo</p> <p>Periodo de realización: Enero 2006-abril 2021.</p> <p>Ámbito: Estudio multicéntrico. 4 hospitales nacionales y conjunto de la población laboral (AWHS).</p> | <p>Población: Pacientes procedentes de 3 cohortes: HUMS (n=3.603), AWHS (N=4.981) y otras unidades lipídicas externas (n=390) evaluados para elegibilidad.</p> <p>HUMS: Media edad 49,1±13,7 años. 54,6% hombres. No HDLc 242,5±69,5 mg/dL; LDL 196±80,8 mg/dL; TG 159 (99-260) mg/dL</p> <p>AWHS: Media edad 47,9±9,1 años. 93,8% hombres. No HDLc 158,1±39,5 mg/dL; LDL 129,0±42,3 mg/dL; TG 118 (88-175) mg/dL</p> <p>Criterios de inclusión: Pacientes ≥18 años, con hiperlipidemia^a, sin tratamiento hipolipemiente y genotipado <i>apoE</i> disponible</p> <p>Criterios exclusión (HUMS): causas secundarias graves (síndrome nefrótico, hipotiroidismo incontrolado), colestasis, uso de fármacos que promueven desorden metabolismo lipídico.</p> | <p>Número de participantes: N=4.954 pacientes <i>apoE2/E2</i></p> <p>Tipo de estudio: Desarrollo de algoritmo diagnóstico para la DBLP y comparación con otros algoritmos descritos en la literatura.</p> <p>Prueba a estudio: Algoritmo diagnóstico para DBLP.</p> <p>Criterios prueba diagnóstica positiva: Se deben cumplir las siguientes condiciones para DBLP: - Presentar hiperlipidemia^a - no-HDLc/apoB ≥1,7 y TG/apoB ≥1,35 perfil lipídico. - Confirmación por análisis genético de <i>apoE</i>.</p> <p>Prueba de comparación: Comparativa con otros algoritmos propuestos en la literatura para diagnóstico de DBLP.</p> | <p>Capacidad diagnóstica: Sensibilidad: 100% (IC95%: 94,40% a 100%)^b. Especificidad: 87,16% (IC95%: 86,19% a 88,08%)^b.</p> <p>Cocientes de probabilidad: CPP: 7,8 (IC95%: 7,2 a 8,4) CPN: 0</p> <p>Exactitud diagnóstica: 87,32% (IC95%: 86,36% a 88,24%)^b.</p> <table border="1"> <caption>Comparación del rendimiento de diferentes algoritmos para la DBLP en un subgrupo de pacientes hiperlipidémicos definidos de acuerdo a cada uno de los algoritmos</caption> <thead> <tr> <th>FUENTE</th> <th>N</th> <th>VP</th> <th>VN</th> <th>FP</th> <th>FN</th> <th>S (%) IC AL 95%</th> <th>E (%) IC AL 95%</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Algoritmo propuesto</td> <td>4.954</td> <td>64</td> <td>4.262</td> <td>628</td> <td>0</td> <td>100 (94,40- 100)</td> <td>87 (86,19%-88,08)</td> </tr> <tr> <td>Sniderman et al. (A)</td> <td>1.183</td> <td>41</td> <td>898</td> <td>237</td> <td>7</td> <td>85,4 (72,24-93,93)</td> <td>79,1 (76,64-81,45)</td> </tr> <tr> <td>Paquette et al. (B)</td> <td>1.858</td> <td>49</td> <td>656</td> <td>1.153</td> <td>0</td> <td>100 (92,75-100)</td> <td>36,26 (34,04-38,53)</td> </tr> <tr> <td>Boot et al. (C)</td> <td>1.889</td> <td>47</td> <td>1.612</td> <td>227</td> <td>3</td> <td>94 (83,45-98,75)</td> <td>87,66 (86,07-89,13)</td> </tr> <tr> <td>Sampson et al. (D)</td> <td>2.872</td> <td>15</td> <td>2.729</td> <td>86</td> <td>42</td> <td>26,32 (15,54-39,66)</td> <td>96,94 (96,24-97,55)</td> </tr> <tr> <td>Sampson et al. (E)</td> <td>2.872</td> <td>36</td> <td>2.592</td> <td>223</td> <td>21</td> <td>63,16 (49,34-75,55)</td> <td>92,08 (91,02-93,05)</td> </tr> </tbody> </table> <p>A HP: apoB<120 mg/dL y TG>133 mg/dL. CD: TC/apoB>2,4 y TG/apoB<8,8 B HP: TC>200 mg/dL y TG>175 mg/dL. CD: No-HDLc/apoB > 1,43 C HP: TC>193 mg/dL y TG>177 mg/dL. CD: No-HDLc/apoB > 1,95 D HP: TG entre 150 y 1000 mg/DL. CD: eS-VLDLc/TG≥0,30 E HP: TG entre 150 y 1000 mg/DL. CD: eS-VLDLc/TG≥0,25 Algoritmo propuesto HP: no HDL≥190mg/dL, LDL ≥160mg/DL, TG ≥150mg/DL. CD: no-HDLc/apoB≥1,7 y TG/apoB≥1,35.</p> | FUENTE | N | VP | VN | FP | FN | S (%) IC AL 95% | E (%) IC AL 95% | Algoritmo propuesto | 4.954 | 64 | 4.262 | 628 | 0 | 100 (94,40- 100) | 87 (86,19%-88,08) | Sniderman et al. (A) | 1.183 | 41 | 898 | 237 | 7 | 85,4 (72,24-93,93) | 79,1 (76,64-81,45) | Paquette et al. (B) | 1.858 | 49 | 656 | 1.153 | 0 | 100 (92,75-100) | 36,26 (34,04-38,53) | Boot et al. (C) | 1.889 | 47 | 1.612 | 227 | 3 | 94 (83,45-98,75) | 87,66 (86,07-89,13) | Sampson et al. (D) | 2.872 | 15 | 2.729 | 86 | 42 | 26,32 (15,54-39,66) | 96,94 (96,24-97,55) | Sampson et al. (E) | 2.872 | 36 | 2.592 | 223 | 21 | 63,16 (49,34-75,55) | 92,08 (91,02-93,05) | <p>El criterio propuesto en el estudio el cual combina el cociente no HDLc/apoB y TG/apoB es una valiosa herramienta para la detección de DBLP en la población con o sin un tratamiento activo de fármacos hipolipemiantes. El diagnóstico de DBLP requiere la coexistencia de hiperlipidemia y la presencia de un genotipo <i>apoE2/E2</i> o la demostración de una mutación patogénica en <i>apoE</i>.</p> |
| FUENTE | N | VP | VN | FP | FN | S (%) IC AL 95% | E (%) IC AL 95% | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Algoritmo propuesto | 4.954 | 64 | 4.262 | 628 | 0 | 100 (94,40- 100) | 87 (86,19%-88,08) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sniderman et al. (A) | 1.183 | 41 | 898 | 237 | 7 | 85,4 (72,24-93,93) | 79,1 (76,64-81,45) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Paquette et al. (B) | 1.858 | 49 | 656 | 1.153 | 0 | 100 (92,75-100) | 36,26 (34,04-38,53) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Boot et al. (C) | 1.889 | 47 | 1.612 | 227 | 3 | 94 (83,45-98,75) | 87,66 (86,07-89,13) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sampson et al. (D) | 2.872 | 15 | 2.729 | 86 | 42 | 26,32 (15,54-39,66) | 96,94 (96,24-97,55) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sampson et al. (E) | 2.872 | 36 | 2.592 | 223 | 21 | 63,16 (49,34-75,55) | 92,08 (91,02-93,05) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>apoB: apolipoproteína E. apoE: apolipoproteína E. AWHS: Estudio de Salud Laboral de Aragón. CD: criterio diagnóstico. CPN: cociente de probabilidad negativo. CPP: cociente de probabilidad positivo. DBLP: disbetalipoproteinemia familiar. E: especificidad. FN: falsos negativos. FP: falsos positivos, HDLc: colesterol de tipo HDL (colesterol de lipoproteínas de alta densidad). HP: Hiperlipidemia. HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet. LDL: lipoproteínas de baja densidad. N: Tamaño muestral. S: sensibilidad. TG: triglicéridos. VLDLc: colesterol de tipo VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad). VN: verdaderos negativos. VP: verdaderos positivos.</p> <p>^a La hiperlipidemia se definió como la presencia de alguna de las siguientes condiciones: niveles de colesterol no HDL≥190mg/dL, LDL ≥160mg/DL, TG ≥150mg/dL. Para confirmar un diagnóstico de DBLP es necesario corroborar la presencia del genotipo APOE2/2 o la demostración de una mutación patogénica en el gen <i>apoE</i>.</p> <p>^b Se hizo uso de la herramienta MedCalc® para el cálculo del CPP, CPN, exactitud diagnóstica e IC (intervalo de confianza) al 95%⁶⁰.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Anexo 9. Modelos predictivos pronóstico para establecer riesgo de aparición de EA de inicio tardío que incluyen genotipado *apoE*

| Estudio | Abdullah et al. 2009 ⁶ | Davatzikos et al. 2014 ⁷ | Hartz et al. 2023 ⁸ | Kauppi et al. 2018 ¹³ | Qiu et al. 2014 ⁹ | Shigemizu et al. 2020 ¹⁰ | Sorensen et al. 2019 ¹¹ | Van Maurik et al. 2019 ¹² |
|--|--|---|--|---|---|--|---|--|
| Diseño y muestra | Retrospectivo. N=2.528 | Retrospectivo. N=813 | Retrospectivo. N >10.000 | Retrospectivo. N=336 | Retrospectivo. N=395 | Retrospectivo N=197 | Retrospectivo. N=544 | Retrospectivo. N=411 |
| Seguimiento (años) | 2 | 6 | 5 | 10 | 7 | 7 | 2 | 8 |
| Factores predictores del modelo | HTA, CT, TG, creatinina en suero, <i>apoE</i> , consumo de estatinas, antihipertensivos, AINEs, cociente $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ | ADAS-Cog, <i>apoE</i> , SPARE-AD index, biomarcadores LCR ($A\beta_{1-42}$, t-tau, p-tau) | Edad, sexo, educación, antecedentes familiares, IMC, depresión, HTA, deterioro cognitivo, PET, IRM (VHC), <i>apoE</i> , $A\beta_{42/40}$ | - Modelo 2: atrofia cerebral (IRM) y PRP (31 SNP + <i>apoE</i>) - Modelo 3: atrofia cerebral (IRM), PRP (31 SNP + <i>apoE</i>), MMSE | Biomarcadores LCR ($A\beta_{42}$ y p-tau), volumen hipocampal, ADAS-Cog, edad, sexo, <i>apoE</i> y DS state. | 24 miR-eQTLs, edad, sexo y <i>apoE</i> . | Modelo 1: Edad, sexo, MMSE, educación y <i>apoE</i> Modelo 4: Modelo 1 + ANCOVA-ROI. Modelo 5: Modelo 1+ COX-ROI | Modelo demográfico: Edad, MMSE, <i>apoE</i> . Modelo IRM: VHC, sexo, MMSE, <i>apoE</i> . Modelo PET: PET, MMSE, <i>apoE</i> . Modelo combinado: PET, VHC, edad, sexo, MMSE y <i>apoE</i> . |
| Umbral factores predictores | $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40} \leq 0,04$: riesgo aumentado ^a | ND | - Nº de alelos $\epsilon 4$: $\epsilon 4 \uparrow$ riesgo - PET \pm: Resultado PET amiloide + si C-PiB >1,42 y >1,22 para AV45 - VHC: $\geq 7\text{cm}^3$ - $A\beta_{42/40}$: cociente $\geq 0,102$ riesgo \uparrow - Educación: Escuela 2 ^a o < ^a | ND | - <i>apoE</i> $\epsilon 4$: 0 alelos (0 p), 1 alelo (1 p), 2 alelos (2 p) - Sexo: Mujer (0 p), Hombre (1 p) - EE: Normal (0 p), EMCI (1 p), LMCI (2 p), EA (3 p) ^a | ND | - <i>apoE</i> $\epsilon 4$ positivo: al menos 1 alelo $\epsilon 4$ presente. - Sexo: Mujeres (0 p) Hombres (1 p) ^a | - <i>apoE</i> $\epsilon 4$ \pm: ≥ 1 alelo $\epsilon 4$ presente. - PET \pm: Resultado PET amiloide - MMSE: buena =30; dañada =25 - Edad: Baja (60 a.); Alta (80 a.) - VHC: percentil 20 y 80 de los resultados obtenidos (cm^3) - VTI: percentil 20 y 80 de los resultados obtenidos (cm^3) |
| Validación interna | No | No | No ^b | No | Sí ^d | Sí ^e | No | No |
| Validación externa | No | No | No | No | No | No | No | Sí |
| Genotipado <i>apoE</i> | ARMS | ND (ADNI) | ND (NACC) | ND (ADNI) | ND (ADNI) | ND | ND (ADNI) | ND (ADNI) |

A β : beta amiloide. **ADAS-Cog:** Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale. **ADNI:** Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. **AINEs:** antiinflamatorios no esteroides. **ANCOVA-ROI:** Análisis de covarianza de regiones de interés. **apoE:** Apolipoproteína E. **ARMS:** Sistema de mutación refractario de amplificación. **AV45:** Florbetapir. **C-PiB:** Componente B de Pittsburgh. **COX-ROI:** análisis de regresión tipo Cox de las regiones de interés. **CT:** Colesterol total. **EA:** Enfermedad de Alzheimer. **EE:** Estado de la enfermedad. **EMCI:** deficiencia cognitiva leve. **HR:** Cociente de riesgos. **HTA:** hipertensión arterial. **IC:** Intervalo de confianza. **IMC:** Índice de masa corporal. **IRM:** Imagen por resonancia magnética. **LCR:** Líquido cefalorraquídeo. **LMCI:** deficiencia cognitiva avanzada. **miR-eQTLs:** Single nucleotide polymorphism-microRNA pairs. **MMSE:** Test Mini-Mental. **Nº:** Número. **ND:** No descrito. **NACC:** National Alzheimer's Coordinating Center. **p:** puntos. **PET:** tomografía por emisión de positrones. **PRP:** Puntuación de riesgo poligénico. **p-tau:** Proteína tau fosforilada. **SNP:** Polimorfismos de un solo nucleótido. **SPARE-AD index:** índice espacial de patrón de anomalías para el reconocimiento de la EA. **T-tau:** Proteína total Tau. **TG:** Triglicéridos. **VHC:** Volumen hipocampal. **VTI:** Volumen total intracraneal.

^a En el artículo no se recogen los valores umbrales del resto de factores predictores.

^b La validación interna que llevan a cabo es independiente para cada uno de los modelos que conforman el modelo final.

^c Los factores predictores de edad y sexo son comunes para el modelo de 2 y 3 factores.

^d **Bootstrap:** Técnica de simulación, consiste en generar observaciones a partir de la distribución de la muestra original de pacientes disponibles. En cada simulación se obtiene una muestra típicamente del mismo tamaño que la muestra original. La muestra simulada se genera mediante un proceso de selección aleatorio de individuos de la muestra original. Esta selección se realiza con reemplazamiento, es decir en cada paso de la simulación cada individuo del conjunto de datos es elegible independientemente de si ha sido seleccionado o no en un paso anterior¹⁶⁹.

^e **Cross validation:** Técnica de validación que consiste en una extensión de la técnica denominada "split-sample" para reducir el sesgo y la variabilidad del rendimiento estimado. Por ejemplo, en una "10-fold cross validation" implica la división aleatoria de los datos en 10 grupos de igual tamaño. El modelo se desarrolla en 9 de los 10 grupos y su rendimiento es evaluado en el grupo restante. Este proceso se repite 10 veces para cada uno de los 10 grupos para validar el modelo¹⁶⁹.

