DETECCIÓN DE ADN DE *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO PROVENIENTE DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Alejandra Pérez[1], Luis Torres[1], Francisco Hernández[1], Luis Gonzalez[2], Wilhelm Izaguirre[2], Pablo Ordaz [3], Ciro Gaona[4].

Aprobado para publicación marzo 2012. Publicado abril 2012

RESUMEN:
La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo y la isoforma 4 de Apolipoproteína E (ApoE) es mundialmente aceptada como un factor de riesgo para el desarrollo de Alzheimer esporádico. La EA se ha asociado con infecciones por Chlamydophila pneumoniae (ChP) debido a que inhibe la respuesta inmune del huésped generando infecciones crónicas. Objetivo: Detectar ADN de ChP en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con diagnóstico clínico de Alzheimer provenientes del Distrito Metropolitano de Caracas. Metodología: se analizaron (7) muestras de LCR de pacientes con diagnóstico clínico de EA y el grupo control estuvo constituido por (13) muestras de LCR de pacientes con Otras Enfermedades Neurológicas (OND) no Demencia. A los cuales se les determino la Isoforma de ApoE, se amplificaron los genes para OmcA y 16Sribosomal de ChP. Resultados: la frecuencia de ApoE isoforma 4 en los pacientes con EA fue (0,57) en contraste con el grupo control donde la frecuencia fue de (0,31)). En todas las muestras analizadas se obtuvo una ausencia de la banda correspondiente a Chlamydophila pneumoniae. Conclusión: la mayor probabilidad es que la bacteria no se encontrara en el LCR de los pacientes. Pero existe la posibilidad de que el ADN de ChP no estuviese en suficiente cantidad como para ser detectado por las técnicas empleadas. Además, debemos considerar que el protocolo de extracción es un punto crítico. Finalmente, los pacientes con diagnóstico clínico de EA y en particular del género femenino tienen mayor frecuencia de tener una copia de ApoE isoforma 4 en su genotipo.

Palabras Claves: Enfermedad de Alzheimer, Apolipoproteína E y *Chlamydophila pneumoniae.*

DNA DETECTION OF *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* IN CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS DIAGNOSED WITH ALZHEIMER DISEASE

SUMMARY
Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the isoform 4 of apolipoprotein E (ApoE) is world accepted as a risk factor for developing sporadic Alzheimer. The AD has been associated with infections by Chlamydophila pneumoniae (ChP) because it inhibits the host immune response causing chronic infections. Objective: to detect ChP DNA in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with clinical diagnosis of Alzheimer's from the Metropolitan District of Caracas. Methodology: We Analyzed (7) CSF samples from patients with clinical diagnosis of AD and control groups consisted of (13) CSF samples from patients with other neurological diseases (OND) no dementia. To which the determined the isoform of ApoE genes were amplified for OmcA and 16sribosomal of ChP. Results: the frequency of ApoE isoform 4 in AD patients was (0.57) in contrast to the control group where the frequency was (0.31). All samples were obtained an absence of the band corresponding to Chlamydophila pneumoniae. Conclusion: the greater likelihood is that the bacteria is not found in the CSF of patients. But there is the possibility that DNA was not ChP insufficient quantity to be detected by the techniques employed. Furthermore, we most consider the extraction protocol is a critical point. Finally, patients with clinical diagnosis of AD and in particular the female are more often have a copy of ApoE isoform 4 in its genotype.

Keywords: Alzheimer's disease, apolipoprotein E, *Chlamydophila pneumoniae.*

Solicitar copia a: ivetth_86@hotmail.com
[1]Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela.
[2]Departamento de Biología Molecular del Laboratorio AVILAB.
[3]Laboratorio Medico de Referencia.
[4]Grupo de Investigación Internacional de Demencia 10/66

Introducción

Conocer que el principal factor de riesgo para padecer la EA, es tener una edad mayor a 65 años (1), y que además suele ser la causa más frecuente de demencia en ancianos, ya que representa del 50 al 75% de los casos (2), no es un futuro alentador; diferenciar entre EA y otros tipos de demencias que cursen con signos y síntomas iguales significa un reto, para el personal del área de la salud. Venezuela no escapa de esta realidad siete de cada cien ancianos tienen demencia senil y/o demencia tipo Alzheimer, según lo que describe el Grupo de Investigación Internacional de Demencia 10/66 (2009)(1) .

El deterioro cognitivo leve, es el estado clínico de transición entre el envejecimiento normal y el envejecimiento por EA (3). Por su parte la EA es una enfermedad neurodegenerativa. El marcador genético que actualmente se realiza en el país es la determinación de la isoforma de ApoE cuya principal fuente a nivel de Sistema Nervioso Central es el astrocito (2). Su función primordial radica en la homeostasis lipídica, mantenimiento de la neuroplasticidad, modulación de la actividad del péptido beta-amiloide y acción antiinflamatoria. La isoforma 4 de ApoE ha sido mundialmente aceptada como un factor de riesgo para el desarrollo de Alzheimer esporádico (4). La EA es una enfermedad multifactorial. En el caso de los procesos infecciosos, ChP ha sido uno de los principales microorganismos investigados. Esto se puede deber a la capacidad de inhibir la respuesta inmune del huésped generando infecciones crónicas (5,6,7).

Metodología

La población consultada consistía en pacientes con deterioro cognitivo. Los pacientes seleccionados cumplían con los siguientes requisitos:

- Diagnóstico de imagen compatible con EA.
- Estudios de laboratorio donde se demuestre que la demencia no tiene causa conocida.
- Evaluación del deterioro cognitivo.
- Ser mayores de 50 años.

El grupo de control estuvo integrado por 13 muestras de LCR de aspecto límpido, incoloros y un contaje celular menor a 5 células por mm3 proveniente de pacientes de diferentes edades con otras enfermedades neurológicas no demencia.

En la tabla 1 se muestra la procedencia de las muestras empleadas.

Las 7 muestras de LCR con diagnóstico clínico EA y las 13 muestras de LCR con Otras Enfermedades Neurológicas no Demencia, fueron transportadas a 4°C y refrigeradas a -70°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron sometidas a un pre-tratamiento en el cual se centrifugo 16.000 g., por 15min. El sedimento que se obtuvo se trato con 20ul de Proteinasa K, este se mezcla en el vortex brevemente y después se coloca en el baño de maría seco a una temperatura de 60°C por 30min. Seguidamente se realizó el protocolo de Extracción de AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit. Se uso la técnica de PCR para la detección de ADN de Chlamydophila pneumoniae (Gen de Amplificación OmcA y 16Sribosomal) y para la genotipificación de ApoE (técnica INNO LiPA ApoE de Innogenetics).

Tabla 1. Procedencia de las muestras empleadas

Facilitador	Cantidad de muestra
Dr. Pablo Ordaz **Director del Laboratorio Clínico de Referencia**	5
Dr. Ciro Gaona **Fundación Alzheimer de Venezuela**	
Dr. Francisco Hernández **Departamento de Neurología del Hospital Clínico Universitario**	2

Resultados

De la población consultada el grupo de pacientes con diagnostico clínico de EA tienen una frecuencia 0,57 de presentar una copia del alelo 4 del gen de ApoE representado un 57% mientras que el grupo control constituido por pacientes con OND no demencia tienen una frecuencia 0,31 de presentar una copia del alelo 4 del gen de ApoE representando un 31%.

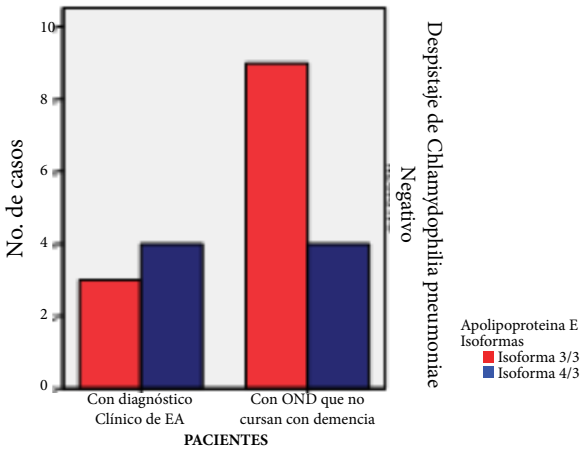


Figura 1. Distribución de muestras con Despistaje de ChP negativo por isoforma de ApoE en las muestreas del grupo de pacientes en estudio y el grupo control.

De la población consultada los pacientes con diagnóstico clínico de EA, del género femenino presentaron una frecuencia 0,75 mientras que los del género masculino presentaron una frecuencia 0,25.

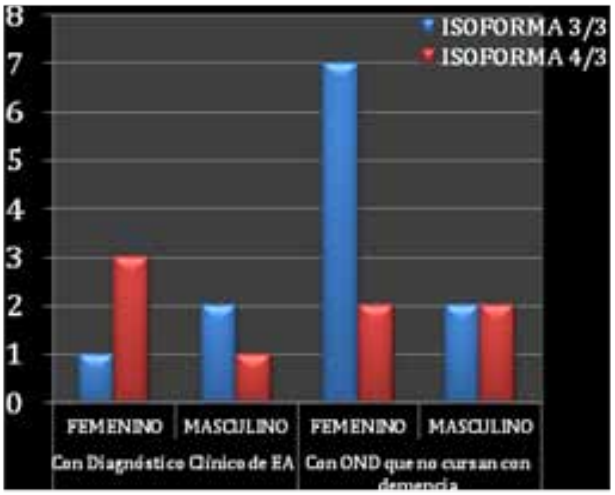


Figura 2. Distribución de muestras con Despistaje de ChP negativo por isoforma de ApoE y género en las muestreas del grupo de pacientes en estudio y el grupo control.

El despistaje para Chlamydophila pneumoniae en las 13 muestras analizadas del grupo control resulto negativo.

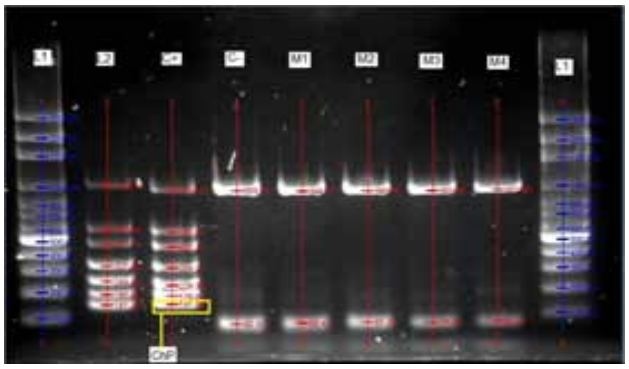


Figura 3. Electroferograma en gel de Agarosa al 2% de los productos de amplificación de los pacientes con OND no demencia usando la técnica Pneumobacter de Seeplex.

El despistaje para Chlamydophila pneumoniae de las 7 muestras con diagnostico clínico de EA resulto negativo por ambas metodologías.

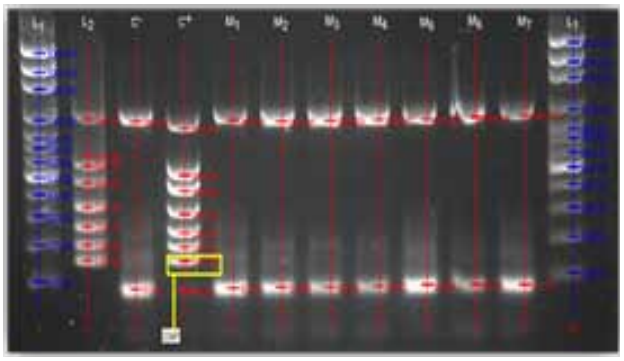


Figura 4. Electroferograma en gel de Agarosa al 2% de los productos de amplificación de los pacientes con Diagnostico Clínico de EA usando la técnica Pneumobacter de Seeplex.

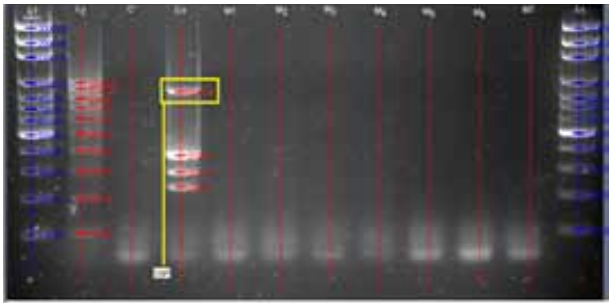


Figura 5. Electroferograma en gel de Agarosa al 2% de los productos de amplificación de los pacientes con Diagnostico Clínico de EA usando la técnica Maxin Biotech

Revelado por Hibridación Reversa de la Genotipificación de ApoE de los pacientes con Diagnóstico clínico de EA



Discusión

En el presente estudio corrobora que la mayor frecuencia de ApoE alelo 4 lo presenta los pacientes con diagnóstico clínico de EA y en particular los del género femenino, similar al reportado por otros investigadores [2,5,8,9,10,11].

No se detectó ADN de ChP en los pacientes con OND no demencia y los pacientes con diagnóstico clínico de EA con las técnicas empleadas.

Las causas por la cual no se observo la banda de ChP se debe a que la misma no estaba en el LCR de los pacientes con EA o por la cantidad insuficiente de ADN de ChP causando que no pudieran ser detectada por las técnicas empleadas. Ha sido reportado que las altas concentraciones de Interferón- gamma y los agentes antimicrobianos causan que ChP no este en cantidad suficiente en los pacientes con EA. Porque ambas inhiben la fase replicativa (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

Finalmente debemos considerar que el proceso de extracción es un punto crítico, en este sentido el protocolo fue efectivo para extraer el ADN de ApoE mas pudiera ser que no fuese el adecuado para extraer el ADN de ChP por las características de la misma.

Referencias

1. Siete de cada cien ancianos sufre demencia o Alzheimer. El Universal. En prensa Agosto 2009.
2. Alzheirmer's Disease International. World Alzheimer report 2009. Available from: URL: http://www.alz.co.uk/research/worldreport. Consultado: el 23 de enero de 2010.
3. Wizel B, Asklin J, Cortes C, Tvinnereim A. Role of CD8 T cells in the host response to Chlamydia. Microbes and Infection 2008; 10: 1420-10.
4. Caspar S, Puissant B, Nazzal D, Lefevre J, Thomsen M, Salvayre R, et al. Chlamydia pneumoniae. Induces Interleukin-10 production that down-regulates Major Histocompatibility Complex Class I Expression. The Journal of Infectious Disease 2000; 182:394-7.
5. Balin B, Little C, Hammond C, Appelt D, Whittum- Hudson J, Gérard H, et al. Chlamydophila pneumoniae and y the Etiology of late – Onset Alzheimer Disease. Journal of Alzheimer´s Disease 2008; 13: 371-9.
6. Mandell G, Gordon R, Bennett J, Mandell DE. Enfermedades infecciosas: principios y práctica. Edición 6. España: Elsevier; 2006.p. 3662
7. Prescott L, Harley J, y Klein D. Microbiología. 5ta edición. España: McGraw –Hill; 2004. p515-3.
8. Orduña C, García E, Rodríguez C, Benito J. Últimos avances en el diagnostico molecular y por imagen de la enfermedad de Alzheimer. El Círculo de Innovación en Biotecnología y la Asociación Afal Contigo 2009: 1-84.
9. Gérard H, Wildt K, Whittum- Hudson J, Lai Z, Ager J, Hudson A. The load of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer´s brain varies with APOE genotype. Microbial Pathogenesis 2005; 39: 19-26.
10. Ewers M, Zhong Z, Bürge K, Wallin A, Blennow K, Teipel S, et al. Increased CSF-BACE I activity is associated with ApoE allelo 4 genotype in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Brain 2008; 131: 1252-6.
11. Molero A, Pino G, Maestre G. Modulation by age and gender of risk for Alzheimer's disease and vascular dementia associated with the apolipoprotein E 4 allelo in Latin Americans: findings from the Maracaibo Aging Study. Neuroscience Letters 2001; 307:5-3.
12. Morrison, R. New insights into a persistent problem -chlamydial infections. J. Clin. Invest. 2003; 111(11): 1647- 3.
13. Balin B, Appelt D. Role of infection in Alzheimer's disease. JAOA 2001; 101 (12): S1-S5.
14. Rivero N. Infección por Chlamydia pneumoniae y crisis asmática. Estudio serológico en el área 10 de la comunidad de Madrid [Tesis Doctoral]. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; 2001.
15. Villegas E, Solórzano A, Camacho A, Gutiérrez J. Chlamydophila pneumoniae: from proteomics to arteriosclerosis. Enferm Infecc Microbiol Clin2008; 26:629-7.
16. Kutlin A, Roblin P, Hammerschlag M. Effect of Prolonged Treatment with Azithromycin, Clarithromycin, or Levofloxacin on Chlamydia pneumoniae in a Continuous-Infection Model. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(2):409–3.
17. Friedman H, Yamamoto Y, Bendinelli M. Chlamydia pneumoniae: infection and disease. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers 2004: 286.
18. Rasmussen S, Eckmann L, Quayle A, Shen L, Zhang Y, Anderson D, et al. Secretion of Proinflammatory Cytokines by Epithelial Cells in Response to Chlamydia Infection Suggests a Central Role for Epithelial Cells in Chlamydial Pathogenesis. The Journal of Clinical Investigation 1997; 99 (1): 77–10.
19. Polkinghorne A, Hogan RJ, Vaughan L, Summersgill JT, Timms P. Differential expression of chlamydial signal transduction genes in normal and interferon gamma-induced persistent Chlamydophila pneumoniae infections.Microbes Infect.2006; 8: 61-11.
20. Caldwell HD. Polymorphisms in Chlamydia trachomatis tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. J. Clin. Invest. 2003; 111:1757-12.
21. Von Bernhardi R. La neuroinflamación en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Boletín de la Escuela de Medicina U.C., Pontificia Universidad Católica de Chile 2007; 32 (1).
22. Manzano S, González JL, Marcos A, Matías J. Genética y enfermedad de Alzheimer. Neurología 2009; 24(2):83-6.
23. Hu J, Van Eldik LJ. Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance beta amyloid-induced glial activation. Brain Res. 1999; 842: 46-8.