

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS

**“ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE HIERRO COMO FACTOR DE  
RIESGO EN LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS  
CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta

**QFB. ROSA GABRIELA MALTA TORRES**

Directora de Tesis

**Dra. Mirna del Carmen Brito Perea**

Co-Directora

**Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala**

Tijuana, Baja California; noviembre de 2016



**Universidad Autónoma de Baja California**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**  
**COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

FOLIO No. 192

Tijuana, B. C., a 4 de noviembre de 2016

**C. Rosa Gabriela Malta Torres**  
**Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud**  
**Presente**

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción TESIS

Es propuesto, por las C. Dras. Mirna del Carmen Brito Perea y Lilia Angélica Hurtado  
Ayala

Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al  
tema: "ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE HIERRO COMO FACTOR DE RIESGO  
EN LA EVOLUCION CLINICA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON ENFERMEDAD  
DE ALZHEIMER"

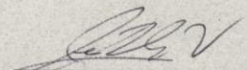
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

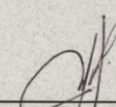
- I.- INTRODUCCION
- II.- ANTECEDENTES
- III.- JUSTIFICACION
- IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- V.- GENERALIDADES
- VI.- OBJETIVO
- VII.- METODOLOGIA
- VIII.- ACTIVIDADES
- IX.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL
- X.- RESULTADOS
- XI.- CONCLUSIONES
- XII.- REFERENCIAS

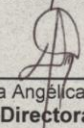
UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE BAJA CALIFORNIA

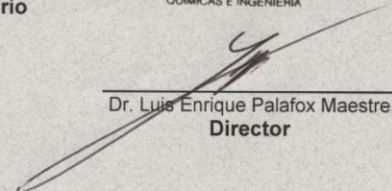


FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS E INGENIERÍA

  
Dr. José Luis González Vázquez  
**Secretario**

  
Dra. Mirna del Carmen Brito Perea  
**Directora de Tesis**

  
Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala  
**Co-Directora de Tesis**

  
Dr. Luis Enrique Palafox Maestre  
**Director**



## CONTENIDO

---

I.	Introducción.....	4
II.	Antecedentes.....	7
III.	Justificación.....	13
IV.	Planteamiento del problema.....	16
V.	Generalidades.....	18
VI.	Objetivo.....	26
VII.	Metodología .....	27
VIII.	Actividades.....	28
IX.	Procedimiento experimental.....	29
X.	Resultados.....	37
XI.	Conclusiones.....	44
XII.	Referencias.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1: Criterios DSM-IV para el diagnóstico de la EA .....	20
Tabla 2: Preparación de muestras para determinación de CTFT.....	33
Tabla 3: Curva de calibración de ferritina.....	35
Tabla 4: Pacientes muestreados y resultados obtenidos.....	38
Tabla 5: Pacientes muestreados y resultados obtenidos.....	38
Tabla 6: Paciente muestreados y resultados obtenidos.....	39
Tabla 7: Porcentajes y frecuencias por sexo y grupo de estudio.....	39
Tabla 8: Diferencias estadísticamente significativas .....	40

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

---

Gráfica 1: Curva de calibración de ferritina.....	35
Gráfica 2: Porcentaje por sexo y grupo de estudio.....	35
Gráfica 3: Porcentajes de niveles de hierro sérico por grupo de estudio.....	39
Gráfica 4: Porcentajes de niveles de CTFT por grupo de estudio.....	39
Gráfica 5: Porcentajes de niveles de IST por grupo de estudio.....	40
Gráfica 6: Porcentajes de niveles de IST por grado de avance o estadio de la EA.....	42

## INTRODUCCIÓN

---

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo, que produce una demencia progresiva en la edad adulta y conduce a un estado de incapacidad absoluta, y a la muerte, en un período no mayor a dos décadas. Por lo general, la EA comienza de forma paulatina y sus síntomas iniciales pueden atribuirse a la vejez o al olvido común (Robles *et. al.*, 2002).

La EA se puede clasificar de diferentes maneras. En función de la edad del paciente al inicio de los síntomas se puede clasificar como: de inicio precoz (antes de los 65 años) y de inicio tardío (después de los 65 años) y a su vez se puede subclasificar de dos formas: esporádica o hereditaria (Romano *et. al.*, 2007).

La EA pasa por diferentes fases que se pueden dividir en tres etapas: Inicial, con una sintomatología ligera o leve, el enfermo mantiene su autonomía y sólo necesita supervisión cuando se trata de tareas complejas. Intermedia, con síntomas de gravedad moderada, el enfermo depende de un cuidador para realizar las tareas cotidianas. Terminal, estado avanzado de la enfermedad, el enfermo es completamente dependiente. Por lo tanto a medida en que la enfermedad avanza, se van deteriorando las capacidades cognitivas, entre ellas la capacidad para tomar decisiones y llevar a cabo tareas cotidianas, y pueden surgir modificaciones de la personalidad, así como conductas problemáticas. En sus etapas avanzadas conduce a la demencia y finalmente a la muerte (Romano *et. al.*, 2007) (Robles *et. al.*, 2002).

La EA es la causa más frecuente de demencia en los países occidentales, por lo que siempre figura en el diagnóstico diferencial de todos los pacientes con deterioro cognitivo (Robles *et. al.*, 2002).

La EA se caracteriza por la asociación de una demencia lentamente progresiva y con hallazgos histopatológicos consistentes en depósitos de filamentos de amiloide llamados placas seniles “placa Amiloide  $\beta$ ” ( $A\beta$ ) y la presencia extracelular de ovillos neurofibrilares o lesiones neurofibrilares corticales, en una cantidad que excede la que podría encontrarse en una persona sana de la misma edad (Tapia, 2007) (Robles *et. al.*, 2002).

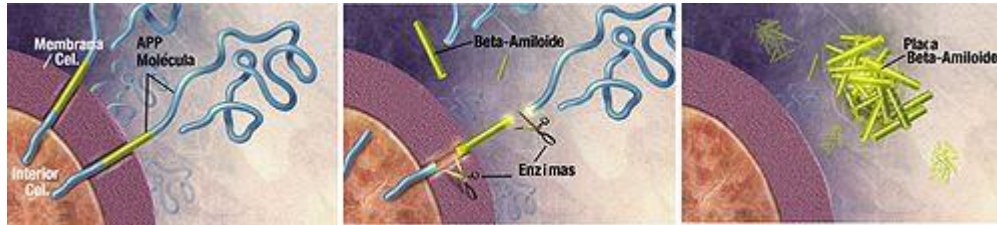


Figura 1: Mecanismo de formación de la placa A $\beta$

La proteína Tau forma parte importante del citoesqueleto en neuronas; estabilizando microtúbulos, manteniendo la forma celular y como vía de transporte axonal. Sin embargo, por mecanismos desconocidos, Tau sufre modificaciones importantes como son fosforilación anormal debida a la actividad desequilibrada de varias cinasas y fosfatasa, afectando su función biológica normal. Bajo estas circunstancias Tau comienza a agregarse originando complejos proteicos denominados desarreglos neurofibrilares (NFTS). Cuando los microtúbulos se colapsan y se desintegran, el sistema de transporte de las neuronas se viene abajo. (Fountain *et. al.*, 2014) (García *et. al.*, 2004) (Christen, 2000).

La placa A $\beta$  se deriva de una proteína transmembrana precursora amiloide (APP) de la cual aún no se conoce completamente su función. Se cree que en la EA se producen complicaciones debido a la elevación de niveles de hierro junto a la acumulación de placa A $\beta$ . La APP posee actividad ferroxidasa, por lo cual cataliza la oxidación de  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$ , y posee una mayor interacción con ferroportina. El hierro oxidado por APP es exportado de la célula por ferroportina, por lo cual se cree que APP estabiliza a ferroportina en la superficie celular. La placa A $\beta$  inhibe a APP lo cual lleva a la inhibición y degradación de ferroportina provocando elevación en los niveles citosólicos de hierro y acumulo de hierro intracelular. Debido a la elevada cantidad de hierro, tanto intracelular como extracelular, se genera estrés oxidativo, debido a la generación de radicales libres, y neurodegeneración (Duce *et. al.*, 2010) (De Domenico *et. al.*, 2007).

El estrés oxidativo severo lleva a graves alteraciones en el metabolismo celular, como rompimiento de Acido desoxirribonucleico (ADN), aumento de la concentración de calcio intracelular, descompartmentalización de iones de  $Fe^{+2}$  y  $Cu^{+2}$  catalíticos, daño a los transportadores membranales de iones y otras proteínas específicas, y peroxidación de lípidos (Martínez *et. al.*, 2003).

El proceso neurodegenerativo de la EA comienza probablemente varios años antes de que aparezcan las primeras manifestaciones clínicas. Al carecer por el momento de marcadores fiables para detectar la EA en esa fase subclínica, su diagnóstico sólo puede hacerse cuando ya se observa un deterioro de las funciones cognitivas (Robles *et. al.*, 2002).

La EA es la causa más común de demencia y no hace distinción de clase socioeconómica, raza ni grupo étnico, afecta por igual a hombres y mujeres, aunque más frecuentemente a personas de edad avanzada, aproximadamente un 10 % en mayores de 65 años y un 47 % en personas de 85 años, aunque también puede presentarse en personas jóvenes (35-50 años) (Instituto de Neurología y Neurocirugía, 2010).

En esta población típica, mayor de 65 años, la enfermedad se desarrolla en forma esporádica, y en su mayoría, no se encuentran o se desconocen antecedentes familiares (solo el 5% de los pacientes afectados desarrolla la forma hereditaria). En los adultos mayores, han sido definidos tres principales factores de riesgo: el envejecimiento mismo, una susceptibilidad genética y el ambiente. De este último se ha encontrado, que la dieta juega un papel muy importante (Acosta *et. al.*, 2012). La incidencia anual reportada de demencia es: en América del Norte de 10.5 por mil, en Europa Occidental de 8.8 por mil, en Latinoamérica de 9.2 por mil, en China de 8 por mil, en Europa Oriental de 7.9 por mil y en África de 3.5 por mil. A nivel global, el número de nuevas personas afectadas es de 4' 600,000 nuevos casos de demencia por año, lo que representa un nuevo caso cada 7 segundos. De estos casos alrededor del 60% corresponden a EA (Allegri *et. al.*, 2011).

En México más de 350,000 personas son afectadas por la EA y mueren por ella anualmente 2,030 pacientes. En Estados Unidos hay 5 millones y mueren anualmente más de 100,000 convirtiendo a la EA en la cuarta causa de muerte entre adultos, apenas por detrás de enfermedades crónico degenerativas y el cáncer. Se estima que uno de cada tres de nosotros enfrentará esta enfermedad en algún ser querido o familiar (Instituto de Neurología y Neurocirugía, 2010).

## ANTECEDENTES

---

En el año 1901 el psiquiatra alemán Alois Alzheimer identificó el primer caso de EA. Pero fue descrita hasta el año 1906, tras la muerte de la paciente afectada (Berchtold *et. al.*, 1998).

El 25 de Noviembre de 1901 ingresó en la Institución para Enfermos mentales y Epilépticos de Frankfurt, Auguste D. una paciente de 51 años internada en dicha institución por su marido. El Dr. Alzheimer, describió el cuadro clínico de la siguiente manera: la paciente tenía olvido, había perdido la capacidad de realizar las labores domésticas y presentaba celos de su marido. Alzheimer se dio cuenta que la paciente tenía fallas de memoria. Auguste D. fallece el 8 de Abril de 1906, tras poco más de 5 años de evolución. Al fallecer la paciente, Alzheimer realizó la anatomía patológica de su cerebro, utilizando técnicas de tinción de plata, y describió las alteraciones cerebrales características de la enfermedad; placas seniles y ovillos neurofibrilares (Behrens *et. al.*, 2007) (Ruiz, 2007).

“Uno de los primeros síntomas de una mujer de 51 años fue un fuerte sentimiento de celos hacia su marido. Pronto mostró progresivos fallos de memoria, no podía encontrar el camino a casa, arrastraba objetos sin sentido, se escondía o a veces pensaba que otras personas querían matarla, de forma que empezaba a gritar. Durante su internamiento, sus gestos mostraban una completa impotencia. Estaba desorientada en tiempo y espacio. De cuando en cuando decía que no entendía nada, que se sentía confusa y totalmente perdida. A veces consideraba la llegada del médico como la visita de un oficial y pedía perdón por no haber acabado su trabajo, mientras que otras veces comenzaba a gritar por temor a que el médico quisiera operarla. En ocasiones lo despedía completamente indignada, chillando frases que indicaban su temor a que el médico quisiera herir su honor. De vez en cuando estaba completamente delirante, arrastrando las mantas de un lado a otro, llamando a su marido y a su hija, y con aspecto de tener alucinaciones auditivas. Con frecuencia gritaba durante horas y con una voz horrible. La regresión mental avanzó gradualmente. Tras cuatro años y medio de enfermedad, la paciente falleció. Al final estaba completamente apática y confinada a la cama, donde adoptaba una posición fetal” (Alzheimer, 1907).

El 3 de Noviembre de 1906 Alzheimer presentaba en la XXXVII reunión de psiquiatras del suroeste de Alemania, en Tubinga, “sobre un proceso patológico peculiar grave de la corteza cerebral”, donde describe los hallazgos encontrados en su paciente ya fallecida (Ezquerro, 2006).

Durante los siguientes cinco años, la literatura médica reportó al menos once casos similares, algunos de ellos utilizando ya el término “enfermedad de Alzheimer”. La enfermedad fue categorizada por primera vez por el psiquiatra alemán Emil Kraepelin después de la supresión de algunos elementos clínicos, así como características histológicas irrelevantes para la enfermedad. En la octava edición de su libro de texto de Psiquiatría, publicado en 1910, incluyó a la enfermedad de Alzheimer, denominada como “demencia presenil”, como un subtipo de demencia senil (Berrios, 1990).

Durante la primera mitad del siglo XX, la EA se consideraba una forma rara de demencia presenil, hasta que se observó que el cerebro de la mayoría de los pacientes con demencia tenía numerosas placas y ovillos, por lo tanto, lo que se llamaba arteriosclerosis o demencia senil era en realidad EA (Behrens *et. al*, 2007). En 1911, Alzheimer, publicaría el caso de Johan F., un paciente de 59 años de edad con una clínica y resultados histopatológicos similares a los de Auguste D. En 1912, Stertz, yerno de Alzheimer, revisó la enfermedad basándose en 22 casos clínicos precedentes de Múnich y Breslau. En 1932, Schottky, es el primero en plantearse el papel de la herencia en esta enfermedad. En 1963, Kidd y Terry, sentaron las bases para la investigación molecular de la enfermedad al describir la ultraestructura de las placas y los ovillos. En 1976 el matrimonio Perrie y Davies confirma el déficit colinérgico de la enfermedad. Los trabajos de Kang y Tanzi en 1987 caracterizan la proteína precursora amiloide (APP) (Ruiz, 2007).

Durante la década 1980-1989, se logró la purificación de los componentes de las placas seniles y ovillos neurofibrilares. El componente principal extraído de la placa senil fue el péptido beta amiloide (A $\beta$ ), un péptido de 40 a 42 aminoácidos. El componente principal del ovillo neurofibrilar fue la proteína Tau, que estabiliza los microtúbulos y así participa en la progresión axoplásmica celular. Estos dos componentes determinaron las dos vías principales de investigación sobre EA en

las últimas décadas. Actualmente, la hipótesis más aceptada es la hipótesis del amiloide, que postula que el elemento principal y primario de la EA es el A $\beta$ , que determina la disfunción sináptica y celular, el depósito de tau, la inflamación y finalmente la muerte neuronal (Behrens *et. al.*, 2007).

Los primeros avances en inmunoterapia para tratar la EA comenzaron en la década 1990 con la administración de una vacuna que indujera la formación de anticuerpos antiamiloides (Behrens *et. al.*, 2007) (Ruiz, 2007).

En 1991 se encuentra la primera mutación del gen APP. En 1993, Perikac-Vance y colaboradores descubren la susceptibilidad de la enfermedad en el alelo E4 del gen ApoE (Apolipoproteína transportadora de colesterol) del cromosoma 19 y en 1995 se descubren mutaciones en los genes de presenilina 1 y 2 como causa de la enfermedad en los cromosomas 14 y 1, respectivamente. En el año de 1995, en los archivos del Hospital Clínico de Frankfurt, Maurer y colaboradores localizaron la documentación clínica original correspondiente al historial de Auguste D (la primer paciente descrita por Alzheimer), con referencias manuscritas del mismo Alzheimer y varias fotografías de la enferma. Posteriormente en 1997, Graeber localizó las preparaciones histológicas correspondientes a la paciente y también las correspondientes a Johan F., el segundo paciente de Alzheimer y cuyo caso fue publicado en 1911 (Ruiz, 2007).

El 21 de septiembre se celebra el Día Mundial del Alzheimer, evento instituido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y auspiciado por Alzheimer's Disease International (ADI) en 1994, con el propósito de dar a conocer la enfermedad y difundir información al respecto (INFOMED, 2015).

En el año 2000 se inician los ensayos clínicos en pacientes humanos con vacunas de anticuerpos antiamiloides, y en el año 2004, Dodel y colaboradores reportaron que la inyección de inmunoglobulinas conteniendo anticuerpos antiA $\beta$  tiene un efecto cognitivo beneficioso en pacientes con EA (Behrens *et. al.*, 2007),

La ferroportina se aisló y caracterizó en el año 2000 anteriormente conocida también como Ireg1 (iron-regulated transporter 1) o MTP1 (metal transporter protein). Es una proteína transmembrana milimétrica (constituida por 571 residuos de aminoácidos) que regula la salida de hierro desde el interior de diversas células. Se une

fuertemente a la membrana celular por medio de unos 9-12 dominios transmembrana y que funciona como un monómero o un dímero. Regula el hierro que se localiza en la membrana basolateral de las células del epitelio duodenal y en el compartimiento citoplasmático de células del sistema retículo endotelial, donde tiene una distribución predominantemente basolateral. No obstante, puede encontrarse en el citoplasma basal y apical de estas células. Está relacionada con la familia de los transportadores de metales divalentes 1 (DMT1) y como transportador de membrana de hierro, para lo que se acopla a la hepcidina (Ezquer *et. al.*, 2006) (Abboud *et. al.*, 2000) (Páez *et. al.*, 2014) (Du *et. al.*, 2014).

La hepcidina es una hormona sintetizada principal pero no exclusivamente en el hígado. Actúa como reguladora central de la homeostasis sistémica del hierro y fue aislada y caracterizada en el año 2001. Se sabe que la hepcidina produce una disminución del hierro plasmático porque inhibe su liberación por las células, especialmente enterocitos y macrófagos. La exportación de hierro del macrófago es regulada por hepcidina, donde ferroportina actúa como receptor, tal efecto tiene como consecuencia la internalización y degradación de ferroportina y como resultado de este evento se bloquea la salida de hierro del macrófago (Nemeth *et. al.*, 2004) (García *et. al.*, 2010) (Du *et. al.*, 2014).

En exceso el hierro celular cataliza la generación de radicales libres que dañan proteínas, ADN y lípidos, mientras que su deficiencia deteriora la proliferación celular. Para mantener el nivel de hierro celular se requiere de mecanismos precisos para su regulación, captación, almacenamiento y exportación. Los principales reguladores de hierro celular en los vertebrados son las proteínas IRP1 e IRP2 (Elementos respondedores al hierro), estas se unen a elementos sensibles de hierro (IRE por sus siglas en ingles) en 3' y 5' o regiones no traducidas del ARNm que codifican para las proteínas implicadas en la absorción de hierro. (Abboud *et. al.*, 2000) (Donovan *et. al.*, 2000) (McKie *et. al.*, 2000) (Casseus *et. al.*, 2008).

Varios procesos neuronales requieren de hierro como mielinización, generación de energía mitocondrial, división celular y neurotransmisión. (McCarthy *et. al.*, 2013).

La homeostasis del hierro es un mecanismo importante en el cerebro de los mamíferos. El flujo de hierro cerebral se mantiene gracias a diversas proteínas que

actúan en conjunto para evitar los efectos tóxicos y dañinos producidos por el hierro, si dicho flujo se altera el daño podría ser irreversible. (McCarthy *et al.*, 2013) (Raha *et al.*, 2013).

Evidencia de estudios recientes indican que existe un disturbio en la homeostasis normal del hierro que contribuye al desarrollo de la EA, esta anomalía en el metabolismo de este importante metal aún no se comprende por completo. (Dong *et al.*, 2015).

El exceso de hierro se ha descrito como causa de muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA. También se ha establecido una aparente relación entre las reservas de hierro en el cerebro y la edad, por lo cual estas se acumulan progresivamente con el tiempo, incrementando la incidencia de la patología. Numerosos estudios han demostrado que el mecanismo de regulación del hierro, así como su transporte y utilización, pueden verse afectados por el proceso natural de envejecimiento. También está ampliamente documentado que esta acumulación progresiva induce estrés oxidativo debido a la generación de radicales libres, promoviendo la muerte celular neuronal, por lo que se ha considerado como la causa inicial de la EA. (Dong *et al.*, 2015) (Raha *et al.*, 2013) (McCarthy *et al.*, 2013).

El incremento anormal de los niveles de hierro en el cerebro, dispara una cascada de eventos perjudiciales que conducen a la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas como la EA. Para prevenir la formación de radicales libres en sangre y en el espacio intersticial del cerebro, los mamíferos han desarrollado métodos para mantener el hierro en su forma reactiva al mínimo. (McCarthy *et al.*, 2013).

El daño por estrés oxidativo, puede ser reversible o irreversible dependiendo de diversos factores como el tiempo que dure el estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes. (Martínez *et al.*, 2003).

Actualmente se han desarrollado diferentes estudios enfocados a la búsqueda de diversos blancos terapéuticos (como APP, Tau, ceruloplasmina, hefaestina, hepcidina y ferroportina) para prevenir la aparición y el desarrollo de EA, así como

para disminuir sus síntomas al ayudar a reducir la placa A $\beta$  una vez que la enfermedad ya ha iniciado. Algunos de estos estudios se han enfocado en el papel que juega el hierro en el desarrollo patológico de la enfermedad. (Fang *et al.*, 2014) (McCarthy *et al.*, 2013) (Dong *et al.*, 2015) (Raha *et al.*, 2013).

## JUSTIFICACIÓN

---

La EA es la causa más común de demencia y no hace distinción de clase socioeconómica, raza ni grupo étnico, afecta por igual a hombres y mujeres, aunque es más frecuentemente en personas de edad avanzada, aproximadamente un 10% en mayores de 65 años y un 47% en personas de 85 años, aunque también puede presentarse en personas jóvenes (35-50 años) (Instituto de Neurología y Neurocirugía, 2010).

En Estados Unidos hay más de 5 millones de personas afectadas por EA y más de 100,000 mueren anualmente convirtiéndola en la cuarta causa de muerte entre adultos mayores. Se prevé que la cantidad de casos en los Estados Unidos superará los 13 millones para el año 2050. La carga económica de cuidar pacientes con EA supera los 100,000 millones de dólares anuales. En México hay más de 350,000 personas afectadas por EA y de estas mueren anualmente alrededor de 2,030. Se calcula que uno de cada tres de nosotros en algún momento de su vida enfrentará esta enfermedad en algún ser querido o familiar (Acosta, 2011) (Instituto de Neurología y Neurocirugía, 2010).

Aunque actualmente no se conoce claramente la etiología y fisiopatología de la EA, existe evidencia reciente que involucra por un lado depósitos aumentados de hierro en cerebros de pacientes afectados por la enfermedad, y por otro lado, hay un incremento de marcadores de estrés oxidativo en el mismo tipo de pacientes (Tapia, 2007).

Se cree que en la EA se producen complicaciones debido a la elevación de niveles de hierro junto a la acumulación de placa amiloide beta ( $A\beta$ ). El incremento anormal de los niveles de hierro en el cerebro, dispara una cascada de eventos perjudiciales que conducen a la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas como la EA. La proteína precursora amiloide (APP) posee actividad ferroxidasa, por lo cual cataliza la oxidación de  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$ . La placa  $A\beta$  inhibe a APP lo cual lleva a la inhibición y degradación de ferroportina provocando elevación en los niveles citosólicos de hierro. Debido a esta acumulación se genera estrés oxidativo, dado que se generan radicales libres y neurodegeneración. (Duce *et al.*, 2010) (De Domenico *et al.*, 2007) (McCarthy *et al.*, 2013).

Se ha definido al estrés oxidativo como un desequilibrio entre la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radicales de hidroxilo ( $\cdot OH$ ), y la disminución o ausencia de los sistemas celulares de respuesta antioxidante, por lo cual, como respuesta ante el estrés oxidativo se incrementa el fenómeno de muerte celular programada o apoptosis (Jiménez, 2006).

La presencia anormal de diversos metales libres (como el cobre, zinc, aluminio y hierro) en el plasma de pacientes con EA ha llamado la atención de muchos investigadores latinoamericanos que han logrado establecer una correlación entre el hallazgo de niveles anormales de estos metales con el desarrollo de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas, debido a su asociación con la producción de ERO (Marra *et. al.*, 2013) (Gutiérrez *et. al.*, 2014).

En un estudio realizado en el año 2005 en Colombia, este incremento apoptótico resultó de la propiedad química del  $Fe^{2+}$  de potenciar al  $A\beta$  para la generación de ERO y con ello incrementar la producción de radicales libres de oxígeno. Debido a este hallazgo se logró establecer un mecanismo operacional alternativo y modulado por el metal, en el cual,  $(A\beta) > H_2O_2 + Fe^{2+} > ERO > caspasa-3 > fragmentación nuclear = apoptosis$  (Jiménez, 2006).

Para prevenir la formación de radicales libres en sangre y en el espacio intersticial del cerebro, los mamíferos han desarrollado métodos para mantener el hierro en su forma reactiva al mínimo (McCarthy *et al.*, 2013).

El estrés oxidativo grave lleva a severas alteraciones en el metabolismo celular, como el rompimiento de ADN, aumento de la concentración de calcio intracelular, descompartmentalización de iones de  $Fe^{+2}$  y  $Cu^{+2}$  catalíticos, daño a los transportadores membranales de iones además de otras proteínas específicas y peroxidación de lípidos (Martínez *et. al.*, 2003).

En un estudio toxicológico realizado en Venezuela durante el año 2013, se midieron los niveles de aluminio sérico y se compararon entre un grupo de pacientes diagnosticados con EA y un grupo de pacientes sanos. Aun cuando los resultados obtenidos de los valores de los niveles de aluminio sérico en ambos grupos

resultaron dentro de los rangos normales, se observó una tendencia de elevación en los pacientes diagnosticados con EA (Gutiérrez, 2014).

En cambio en otros estudios realizados en temporalidades separadas (entre el 2010 y el 2012) en la Universidad Nacional de la Plata en Argentina, donde se realizaron estudios de determinación de niveles séricos de cobre en pacientes diagnosticados con EA y a sus parientes directos. Debido a los resultados obtenidos los investigadores no solamente lograron establecer una correlación entre los niveles elevados de cobre y el desarrollo de la EA, sino que también fueron capaces de establecer la relación del mismo con el grado de avance de la EA en sus sujetos de estudio (Marra, *et. al.*, 2013) (Cristalli, *et. al.*, 2012) (Arnal, *et. al.*, 2010).

En otro estudio realizado durante los años de 1994 a 1995 en España, pero en pacientes diagnosticados con Enfermedad de Parkinson, se midieron los niveles de distintos parámetros incluidos en el perfil de hierro, tales como hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro, transferrina, ferritina e índice de saturación de la transferrina. Los resultados obtenidos se encontraban dentro de los rangos normales, pero con una notoria tendencia a la elevación en los niveles de transferrina y ferritina en los pacientes con Enfermedad de Parkinson en comparación con los pacientes control (Larumbe *et. al.*, 2001).

Dado que aún no se encuentra completamente esclarecido el mecanismo que produce el acumulo de hierro en las células cerebrales, es necesario verificar los niveles de las principales proteínas y hormonas que participan en el proceso metabólico del hierro con la finalidad de asociarlos al desarrollo de la EA y con ello proponerlos como marcadores de diagnóstico clínico de apoyo.

La importancia de un estudio clínico biológico, sin necesidad de métodos invasivos, costosos o postmortem, puede aportar al médico la información necesaria para proporcionar al paciente un diagnóstico certero, confiable y oportuno. Con esto se podría iniciar un tratamiento que ayude a reducir los daños provocados por el estrés oxidativo y la neurodegeneración que favorecen el desarrollo de los síntomas típicos de esta devastadora patología.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

La EA se ha convertido en un problema social muy grave para millones de familias y para los sistemas nacionales de salud de todo el mundo. Es una causa importante de muerte en los países desarrollados, por detrás de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo, lo que hace que esta demencia tenga un impacto tan fuerte en el sistema sanitario y en el conjunto de la sociedad es su carácter irreversible, la falta de un tratamiento curativo y la carga que representa para la familia de los afectados. La enfermedad suele tener una duración media aproximada de 10-12 años, aunque esto puede variar mucho de un paciente a otro (Romano *et. al.*, 2007).

Para el diagnóstico diferencial entre EA y otras demencias, es fundamental explorar con detalle particularidades de los síntomas cognitivos, de las alteraciones motoras y cambios del comportamiento (Acosta *et. al.*, 2012).

Los criterios diagnósticos de la EA más reconocidos no permiten diferenciarla adecuadamente de otras demencias degenerativas, sin embargo, es necesario actualizar los criterios diagnósticos de la EA para optimizar su especificidad, valorando sus manifestaciones clínicas más características, sus marcadores más reconocidos y los rasgos propios de otras demencias que suelen considerarse en el diagnóstico diferencial. La EA puede diagnosticarse con seguridad en los pacientes con demencia y con demostración de las lesiones histopatológicas características de la enfermedad, generalmente a través de necropsia. El hallazgo en el análisis genético de una de las mutaciones conocidas en un paciente con demencia también conduce al diagnóstico con una certeza muy próxima al 100%. No obstante, más del 95% de los casos de EA corresponde a la forma esporádica, y el médico debe afrontar el diagnóstico basado en datos clínicos, apoyado de pruebas complementarias (Robles *et. al.*, 2002).

Se conoce poco sobre el mecanismo de estrés oxidativo y neurodegeneración que ocurre en la EA, ya que no existen muchos estudios enfocados al depósito de hierro en las células neuronales que lleva progresivamente a su destrucción y a la formación de la placa A $\beta$  (James *et. al.*, 2010) (De Domenico *et. al.*, 2007), por lo que aún no existe un método de diagnóstico clínico confiable que ayude a

diferenciar esta patología. El desarrollo de un estudio de diagnóstico clínico biológico como lo es la determinación y asociación de diversos parámetros relacionados con el metabolismo del hierro y la evolución clínica de la EA podría proporcionar un apoyo en este campo poco conocido con la finalidad de proporcionar un diagnóstico clínico diferencial oportuno para iniciar de forma precoz con el tratamiento médico adecuado.

## GENERALIDADES

---

El envejecimiento es un proceso biológico asociado a los efectos del paso del tiempo sobre las moléculas, células, órganos y sistemas que conforman nuestro organismo, y está relacionado con la genética y el ambiente. La estructura del cerebro experimenta cambios de manera constante, desde el nacimiento y durante todo el transcurso de nuestra vida, por lo tanto, el envejecimiento “normal” está asociado también con cambios cerebrales: tales como una disminución en el peso y volumen del cerebro el cual se acompaña de disminución neuronal. (Lerín *et. al.*, 2013).

La disminución de los niveles de células neuronales provoca cambios cognitivos o de memoria en las personas de edad avanzada. Los cambios cognitivos debido al envejecimiento normal varían entre individuos, pero en general los adultos jóvenes y los ancianos rinden de forma diferente en tareas de resolución de problemas. Al llegar a la tercera edad la capacidad de retener información nueva en la memoria va disminuyendo pero se conserva la información relevante y conocida (Weiner, 2005).

Como respuesta a estos cambios el cerebro posee mecanismos de compensación o adaptación los cuales podrían ser la causa de diversas enfermedades neurodegenerativas como demencia, Alzheimer y Parkinson (Lerín *et.al.*, 2013).

La EA es una enfermedad multifactorial irreversible y progresiva del cerebro que lentamente destruye la memoria y las aptitudes del pensamiento, y con el tiempo puede llevar a la falta de capacidad de realizar las tareas cotidianas hasta la pérdida de habilidades motoras y cognitivas. En la mayoría de las personas afectadas con esta enfermedad, los primeros síntomas aparecen a partir de los 60 años de edad aunque se han reportado formas juveniles poco comunes en que estas manifestaciones se presentan a partir de los 35 años de edad (Alzheimer's Disease International, 2009) (Instituto Nacional Sobre el Envejecimiento, 2010) (Lerín *et.al.*, 2013).

La EA es la causa más común de demencia en los adultos mayores. La demencia en si es la pérdida del funcionamiento cognitivo, es decir la capacidad de pensar, recordar y razonar, a tal grado que llega a afectar directamente la vida de la persona,

sus actividades diarias y su habilidad de controlar su propio cuerpo (Instituto Nacional Sobre el Envejecimiento, 2010).

La demencia se define como una reducción o alteración de múltiples capacidades cognitivas (incluida la memoria) suficiente como para interferir en el propio cuidado, en el trabajo o en las relaciones sociales. Este déficit intelectual aparece sin que se altere el nivel de conciencia y puede o no ser permanente. Se han elaborado informes acerca de situaciones reversibles causantes de demencia tales como: trastornos metabólicos uso de sustancias de abuso, fármacos, alcohol, neurosífilis e infecciones fúngicas, tumores, epilepsia y depresión (Weiner, 2005)

El síndrome demencial se caracteriza por una sintomatología diversa que puede confundirse con otras enfermedades como lo es la EA. Entre dichos síntomas se encuentran: alteraciones de orientación, lenguaje, memoria, atención, funciones ejecutivas, cambios de humor y personalidad, delirios y alucinaciones (Acosta *et. al.*, 2012).

El diagnóstico de las demencias se realiza con base en los criterios especificados en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV TR) de la Asociación Psiquiátrica Americana; y en la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) de la Organización Mundial de la Salud. En la Tabla 1 se muestran los criterios descritos en la DMS-IV para el diagnóstico diferencial de la EA (Weiner, 2005) (Acosta *et. al.*, 2012) (Lerín *et.al.*, 2013).

El diagnóstico de la EA es difícil de realizar. En primer lugar la EA es diagnosticada por “proceso de eliminación”, se van descartando otras demencias o enfermedades que produzcan déficits cognitivos. Tanto los test neurológicos como las pruebas de neuroimagen y de laboratorio pueden conducir hacia el diagnóstico de la enfermedad pero la única forma de confirmarla es a través del estudio post mórtem del tejido cerebral (Lerín *et.al.*, 2013).

La evaluación de los individuos que cursan con alteraciones o síntomas cognitivos implica una revisión completa de las posibles causas médicas, neurológicas y psiquiátricas de disfunción cognitiva. Entre los criterios de diagnóstico de la demencia se encuentran: Aparición de déficits cognitivos manifestados principalmente por el deterioro de la memoria, alteraciones del funcionamiento

ejecutivo (planificar, organizar, establecer secuencias, abstraer, etc.), lenguaje, actividades motoras y reconocimiento de objetos (Acosta *et. al.*, 2012).

Tabla 1: Criterios DSM-IV para el diagnóstico de la EA

<ol style="list-style-type: none"><li>1. Desarrollo de deficiencia cognitiva múltiple, manifestada por<ol style="list-style-type: none"><li>1. Alteración de memoria (aprender nueva información y evocar la ya aprendida), y</li><li>2. Una o más de las siguientes alteraciones cognitivas:<ol style="list-style-type: none"><li>1. Afasia</li><li>2. Apraxia</li><li>3. Agnosia</li><li>4. Alteración de funciones ejecutivas</li></ol></li></ol></li><li>2. Las alteraciones previas representan un deterioro con respecto a las capacidades previas del paciente, y producen dificultades significativas en las funciones ocupacional y social.</li><li>3. La evolución se caracteriza por instauración gradual y deterioro cognitivo continuo.</li><li>4. Las alteraciones expresadas en A.1 y A.2 no se deben a lo siguiente:<ol style="list-style-type: none"><li>1. Otros trastornos del sistema nervioso central que puedan ocasionar deterioro progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas (por ej. enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia de presión normal, tumor cerebral).</li><li>2. Trastornos sistémicos que pueden ocasionar demencia (por ej. hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B12, ácido fólico, niacina, hipercalcemia, neurosífilis, SIDA)</li><li>3. Intoxicaciones</li></ol></li><li>5. Las alteraciones no ocurren únicamente durante un síndrome confusional agudo.</li><li>6. El trastorno no es atribuible a una alteración psiquiátrica que pudiera justificar las manifestaciones, como por ejemplo una depresión mayor o una esquizofrenia.</li></ol>
---

Dentro de los estudios que se consideran de utilidad para realizar el diagnóstico de demencia, se encuentran diversos estudios de laboratorio para descartar la posibilidad de enfermedades infecciosas y de origen metabólico así como pruebas para determinar drogas de abuso en el sistema del paciente (Weiner, 2005) (Acosta *et.al.*, 2012).

En cuanto a los estudios de sangre recomendados para el diagnóstico de la EA se encuentran: concentraciones de glucosa, creatinina/nitrógeno ureico plasmático (BUN), folato y vitamina B12, función tiroidea, velocidad de sedimentación globular (VSG), citometría hemática completa, calcio, magnesio, hemoglobina glicosilada, pruebas de función hepática, perfil lipídico y pruebas toxicológicas. Un cambio reciente es que la prueba de sífilis debe realizarse si existe sospecha de neurosífilis.

Se debe realizar de igual manera un estudio de orina rutinario para descartar infecciones que pudieran provocar delirios. Por la misma razón también realizar un estudio de líquido cefalorraquídeo resulta de utilidad. Otros estudios recomendados para el diagnóstico de la EA son: neuroimagen (resonancia magnética o tomografía axial computarizada), cisternograma (descartar hidrocefalia), angiografía (aneurismas, malformaciones, abscesos y neoplasias mediante la inyección de medio de contraste en la arteria femoral, braquial o carótida), biopsia cerebral, ultrasonografía carotídea transcraneal y electroencefalografía (Weiner, 2005).

Las vidas de los familiares directos de los pacientes con EA también se ven afectadas. Debido al deterioro progresivo que sufre el paciente, llega un momento en el cual le es imposible valerse por sí mismo y requiere en todo momento de alguien que esté con él para ayudarlo a realizar las tareas más simples que para cualquier otra persona resultarían básicas como bañarse o ingerir alimentos (Instituto Nacional Sobre el Envejecimiento, 2010).

No se conoce con exactitud la causa de la EA, se sabe que el daño al cerebro comienza entre 10 a 20 años antes de que se evidencien los primeros síntomas. La placa A $\beta$  y los ovillos neurofibrilares empiezan a desarrollarse en la parte más profunda del cerebro. A medida que se va formando más placa y ovillos las neuronas sanas empiezan a funcionar con menos eficiencia. Luego pierden su habilidad de funcionar y comunicarse entre sí, y finalmente empiezan a morir. A medida que las neuronas van muriendo la masa cerebral va disminuyendo, el cual es un hallazgo compartido con la demencia (Instituto Nacional Sobre el Envejecimiento, 2010) (Weiner, 2005) (Lerín *et.al.*, 2013).

El cerebro de un paciente con EA suele estar atrófico con agrandamiento de los ventrículos y los surcos. El peso del cerebro total siempre se encuentra reducido. Los signos anatomopatológicos distintivos son las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares descritos por Alzheimer. Las placas neuríticas están formadas por un material proteínico anormal llamado A $\beta$  derivado de la proteólisis de una proteína transmembrana denominada APP. Las placas son microscópicas de entre 15 a 100 $\mu$  de diámetro y suelen distribuirse entre la corteza y los núcleos límbicos. La máxima concentración se localiza en el hipocampo (el cual es esencial para la

formación de recuerdos). Las placas con alta proporción de elementos neuronales presinápticos distorsionados (neuritas distróficas) se llaman placas neuríticas. Generalmente se observan células microgliales activadas en el centro denso de placa A $\beta$  y en la periferia se pueden observar astrocitos. Las placas que carecen de centro denso se conocen como placas difusas, las cuales no se encuentran directamente asociadas con pérdida neuronal ni disfunción cognitiva. Las marañas u ovillos neurofibrilares son el segundo hallazgo clásico de la EA. Estas son colecciones intracelulares de filamentos anormales, con una estructura helicoidal apareada característica. Se observan en toda la neocorteza y los núcleos límbicos y su densidad está relacionada con el grado de pérdida neuronal. Abunda en la región basal del prosencéfalo, la sustancia negra, los núcleos de rafe y el locus ceruleus. Los ovillos ocupan gran capacidad de los cuerpos celulares de las neuronas piramidales afectadas. Estas neuronas son responsables de las proyecciones axonales largas que facilitan la comunicación interhemisférica e intrahemisférica y parecen especialmente sensibles a la EA. Los neuropilos filiformes son otro hallazgo neuropatológico característico de la EA que se relaciona con los ovillos. Estos se encuentran dispersos por la matriz extracelular de la corteza cerebral y consiste en estructuras filamentosas helicoidales apareadas (como en el caso de los ovillos) y también se agrupan entre las neuritas distróficas de las placas neuríticas. En la EA hay pérdida sináptica cortical generalizada, los pacientes con experimentan un déficit cognitivo y conductual progresivo debido a dicha pérdida. Los oligómeros de A $\beta$  han sido implicados como sinaptotóxicos directos. Las capas profundas de la corteza temporal y el hipocampo son las que sufren el mayor grado de pérdida sináptica (Weiner, 2005).

La proteína APP es una glicoproteína de membrana con un único dominio transmembranal, una porción intracitoplasmática y una porción larga extracelular. Tiene una región hidrofóbica que lo ancla a la membrana celular. En la EA se cree que existe una alteración en el metabolismo de la A $\beta$ , el cual tiene un papel neurotóxico ya que desencadena una reacción neuroinflamatoria donde se observan alteraciones en el calcio, hierro, cobre, aluminio y zinc, la producción masiva de radicales libres (estrés oxidativo) y procesos neuroinflamatorios que

producen daño neuronal que termina en la activación de la cadena de las caspasas llevando a la célula a apoptosis (Acosta, 2012) (Martínez *et. al.*, 2003) (Jiménez, 2006) (Lerín *et.al.*, 2013).

En estudios recientes de biopsias cerebrales de pacientes diagnosticados con EA se han encontrado cantidades considerables de hierro libre en la periferia de las placas A $\beta$ , lo cual ha despertado el interés de la comunidad científica de la relación que pudiera existir entre este importante mineral y el desarrollo de la EA. En exceso el hierro celular cataliza la generación de radicales libres que dañan proteínas, ADN y lípidos, mientras que su deficiencia deteriora la proliferación celular. Para mantener el nivel de hierro celular se requiere de mecanismos precisos para su regulación, captación, almacenamiento y exportación (Dong *et.al.*, 2015) (Abboud *et.al.*, 2000).

Se cree que se producen complicaciones debido a la elevación de niveles de hierro junto a la acumulación de placa A $\beta$ . El incremento anormal de los niveles de hierro en el cerebro, dispara una cascada de eventos perjudiciales que conducen a la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas como la EA. La proteína precursora amiloide (APP) posee actividad ferroxidasa, por lo cual cataliza la oxidación de Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup>. La placa A $\beta$  inhibe a APP lo cual lleva a la inhibición y degradación de la proteína ferroportina, que es la única capaz de exportar hierro fuera de la célula, provocando elevación en los niveles citosólicos de hierro. Debido a esta acumulación se genera estrés oxidativo, dado que se generan radicales libres y neurodegeneración. (Duce *et al.*, 2010) (De Domenico *et. al.*, 2007) (McCarthy *et al.*, 2013).

El estrés oxidativo severo lleva a graves alteraciones en el metabolismo celular, como rompimiento de Acido desoxirribonucleico (ADN), aumento de la concentración de calcio intracelular, descompartimentalización de iones de Fe<sup>+2</sup> y Cu<sup>+2</sup> catalíticos, daño a los transportadores membranales de iones y otras proteínas específicas, y peroxidación de lípidos (Martínez *et. al.*, 2003).

La EA se puede clasificar de diferentes maneras. En función de la edad del paciente al inicio de los síntomas se puede clasificar como: de inicio precoz (antes de los 65

años) y de inicio tardío (después de los 65 años) y a su vez se puede subclasificar de dos formas: esporádica o hereditaria (Romano *et. al.*, 2007).

La forma esporádica se caracteriza por la falta de tendencia hereditaria para el desarrollo de la EA, y suele ser más común (95% de los casos) que la forma hereditaria (5% de los casos) donde se diagnóstica alguna de las mutaciones conocidas de la EA (Romano *et. al.*, 2007) (Robles *et. al.*, 2002).

No existen marcadores genéticos rutinarios recomendados para el diagnóstico de la EA. Las pruebas genéticas pueden ser apropiadas para algunas personas asintomáticas en casos relacionados de demencias hereditarias (Weiner, 2005).

En la forma hereditaria de la EA se encuentra un patrón autosómico dominante. Por lo general estos individuos presentan síntomas antes de los 55 años. Hasta el 75% de los casos familiares de comienzo temprano se asocian con mutaciones en los cromosomas 1, 14 y 21. Todas las mutaciones conocidas determinan producción excesiva de A $\beta$ . En la forma esporádica de la EA también pueden encontrarse mutaciones conocidas que son poco comunes en la forma hereditaria como la combinación alélica del  $\epsilon$ 4 de apolipoproteína E (ApoE), esta es una proteína transportadora de lípidos codificada en el cromosoma 19 que también se une a A $\beta$  circulante. El riesgo particular de desarrollar EA se asocia con el genotipo  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4. Se han identificado otros loci como factores de riesgo en los cromosomas 2, 9, 10, 12 y 15, pero aún no se conocen los defectos genéticos específicos ni los mecanismos por los cuales estos generan riesgo. La presencia de las mutaciones presenilina 1 (Ps1) y presenilina 2 (Ps2) también está ligada a la aparición de la EA familiar. La mutación de estos genes también tiene una tendencia similar al de ApoE y APP ya que incrementan los niveles de A $\beta$  (Acosta *et. al.*, 2012) (Weiner, 2005) (Weiner, 2010) (Lerín *et.al.*, 2013).

La EA se puede dividir en tres fases o estadios de desarrollo: Inicial, intermedio y avanzado. En la fase inicial comienza el deterioro de la memoria con síntomas simples que pueden atribuirse al envejecimiento normal y que afectan levemente la vida social y laboral de la persona afectada. Estos síntomas pueden incluir: perderse, dificultad para manejar el dinero y pagar las cuentas, repetir las preguntas, tomar más tiempo para completar las tareas cotidianas, juicio deficiente y pequeños

cambios en el estado de ánimo y personalidad. En la fase intermedia la confusión y la pérdida de memoria aumentan, y las personas comienzan a tener problemas para reconocer a sus familiares y amigos, no pueden aprender cosas nuevas ni llevar a cabo tareas que requieren múltiples pasos. Es posible que experimenten alucinaciones, delirios, paranoia y comportamiento impulsivo. En el estadio avanzado el paciente ya no puede comunicarse, vestirse o comer y pierden control de los esfínteres, por lo cual depende completamente de otros para su cuidado hasta que su cuerpo deja de funcionar (Lerín *et.al.*, 2013) (Instituto Nacional Sobre el Envejecimiento, 2010).

Se han encontrado deficiencias en la producción de neurotransmisores asociados al exceso de A $\beta$  y ovillos neurofibrilares como son acetilcolina, noradrenalina, serotonina y ácido glutámico, lo cual explicaría una diversidad de los síntomas característico de la EA. Por tal motivo (aunque actualmente no existe un tratamiento que sea capaz de curar la EA) parte del tratamiento farmacológico utilizado en el tratamiento de esta patología se incluyen aquellos que pueden incrementar los niveles de dichos neurotransmisores con la finalidad de mejorar algunos síntomas propios del comportamiento del paciente como confusión, depresión, problemas del sueño y agitación (Acosta *et. al.*, 2012) (Weiner, 2010) (Weiner, 2005).

## **OBJETIVO**

---

Detectar alteraciones en el metabolismo de hierro mediante la determinación de niveles de hierro sérico, ferritina, transferrina, índice de saturación de la transferrina (IST), capacidad total de fijación de la transferrina (CTFT) y hepcidina, basados en técnicas de turbidimetría e inmunoensayos (ELISA), con la finalidad de considerarlos como posibles factores de riesgo en la evolución clínica de pacientes diagnosticados con Enfermedad de Alzheimer (EA).

1. Determinar alteraciones del metabolismo de hierro en pacientes con y sin diagnóstico de EA.
2. Determinar si existe correlación entre los valores obtenidos de las diferentes variables relacionadas al metabolismo de hierro y el estadio de la EA en pacientes diagnosticados.
3. Comparar los valores obtenidos de los diversos parámetros determinados relacionados con el metabolismo de hierro en pacientes diagnosticados con EA con los de pacientes sanos entre los mismos rangos de edad, para tratar de determinar el rol de dichos factores en la evolución clínica de dicha patología.

## **METODOLOGÍA**

---

Estudio transversal prospectivo, realizado con pacientes pertenecientes que pertenecen a diferentes asilos privados de la ciudad de Tijuana diagnosticados con Enfermedad de Alzheimer durante el periodo de octubre del año 2015 a Febrero del año 2016. Se incluyeron 32 pacientes femeninos y/o masculinos a partir de 60 años de edad con diagnóstico de EA y 31 pacientes sin diagnóstico de dicha patología dentro del mismo rango de edad los cuales se incluyeron como grupo control.

Se obtuvieron muestras de sangre periférica mediante técnicas convencionales con un volumen mínimo de 2 ml por tubo (volumen final de 6 ml). Se obtuvieron un tubo con tapón lila con EDTA y dos tubos con tapón oro con gel separado para las muestras de suero. Las muestras debieron ser tomadas antes de las 12 pm y los pacientes debían cumplir con un ayuno mínimo de 4 horas.

Se excluyeron aquellos pacientes masculinos y femeninos menores de 60 años de edad, sin ayuno, con menor volumen al requerido (2 ml), hemolizadas, coaguladas y/o lipémicas y aquellas que excedieran el tiempo de almacenamiento (24 horas en frío y 1 mes en congelación).

Para este estudio las variables dependientes estuvieron determinadas por la presencia de diversas alteraciones en el metabolismo de hierro, los cuales dependerán de la edad del paciente, su dieta y del estadio en el cual se encuentra la patología y su relación con la evolución clínica de la misma. Por tal motivo, estas últimas se consideraron como variables independientes.

En cuanto a la parte estadística los datos fueron agrupados por grupos de edad, tanto en pacientes diagnosticados con EA como con los pacientes sin la enfermedad (incluidos en el grupo control) y se utilizó el estadístico de correlación y frecuencia chi-cuadrada ( $p < 0.05$ , con un índice de confianza del 95%) para establecer si existe una relación entre el hallazgo de alteraciones del metabolismo de hierro en la evolución clínica (dependiendo el estadio) de los pacientes diagnosticados con EA, en comparación con los datos obtenidos de los pacientes pertenecientes al grupo control. Lo anterior se logró mediante el uso del programa estadístico SPSS versión 22 y, para el análisis de resultados, se utilizaron gráficas de barras como auxiliares visuales.

## **ACTIVIDADES**

---

1. Selección de pacientes.
2. Aplicación de encuesta y consentimiento informado a familiares de pacientes.
3. Extracción de muestras sanguíneas.
4. Transporte de muestras.
5. Procesamiento de muestras.
6. Almacenamiento de muestras.
7. Preparación de calibradores, muestras y controles.
8. Corrida de calibradores, muestras y controles.
9. Cálculo de resultados.
10. Procesamiento de resultados en programa SPSS versión 22.
11. Elaboración de gráficas y tablas.
12. Discusión de resultados.
13. Redacción de conclusiones.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A todos los familiares de los pacientes participantes del estudio se les entrego un formato de consentimiento informado (Imagen 1) y una pequeña encuesta con la finalidad de recaudar información general sobre el estado de salud y alimentación del paciente (Imagen 2).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre: \_\_\_\_\_ Apellidos: \_\_\_\_\_

**Introducción/Objetivo:**  
Proyecto de investigación DETERMINACIÓN DE PERFIL DE HIERRO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER PARA POSIBLE USO DIAGNÓSTICO  
Director (a) de Tesis: Dra. en C. Mima del Carmen Brito Perea.  
Tesis: QFB. Rosa Gabriela Malta Torres  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC campus Tijuana.

**Procedimientos:**  
Si Usted acepta participar en el estudio, ocurrirá lo siguiente:  
Se le realizaran algunas preguntas de carácter general y de salud tales como: Su nombre, edad y teléfono de contacto, si cuenta o no con diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer, hace cuánto tiempo le fue diagnosticada la enfermedad y/o en que estadio de la misma se encuentra, si es diabético o hipertenso y si toma algún medicamento. Se obtendrán muestras de sangre venosa en tubos al vacío con EDTA (3ml) y sin anticoagulante (7.5ml) para la obtención de suero y sangre total. Se realizará con sus muestras una biometría hemática completa, extendido de sangre periférica y perfil de hierro completo. Se le entregará una copia de sus RESULTADOS al término del estudio.

**Confidencialidad:**  
Toda la información que USTED nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

**Riesgos Potenciales/Compensación:**  
Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. AL REALIZAR LA TOMA DE MUESTRA DE SANGRE PUEDE SUFRIR UN PEQUEÑO MORETE O POCO DOLOR EN EL MOMENTO. EL MATERIAL QUE SE UTILIZARÁ ES NUEVO Y DESECHABLE. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para usted.

**Participación Voluntaria/Retiro:**  
La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera la forma en cómo le traten en la Universidad Autónoma de Baja California campus Tijuana.

**Números a Contactar:**  
Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con la investigadora responsable del proyecto:  
QFB. Rosa Gabriela Malta Torres al siguiente número de teléfono 664-116-18-65

Si usted acepta participar en el estudio, le pedimos sea tan amable de firmar:  
"He leído y acepto los términos y condiciones desortas en el consentimiento informado"

Firma del participante voluntario o familiar: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Firma del Testigo: \_\_\_\_\_

Firma del representante del proyecto: \_\_\_\_\_

Imagen 1. Consentimiento informado

FECHA: \_\_\_\_\_

No. FOLIO: \_\_\_\_\_

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería  
Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud

De antemano gracias por su apoyo en la realización de la siguiente encuesta que servirá como base de datos para nuestro proyecto de investigación, le aseguramos que esta información es totalmente **CONFIDENCIAL**.

- Nombre: \_\_\_\_\_

- Número de teléfono: \_\_\_\_\_

1. Lugar de Nacimiento: \_\_\_\_\_

2. Género: \_\_\_\_\_

3. Edad: \_\_\_\_\_ Años.

4. ¿Cuenta con diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer?  
a) Si ( ) b) No ( )

5. ¿Hace cuánto tiempo le diagnosticaron la Enfermedad de Alzheimer?  
a) 1-6 años ( ) b) 7-13 años ( ) c) 14-20 años ( ) d) No sabe ( )

6. ¿Recibe o recibió algún tipo de tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer?  
a) No ( ) b) Sí, ¿Cuál? \_\_\_\_\_

7. ¿Sufre diabetes?  
a) Sí ( ) b) No ( )

8. ¿Sufre hipertensión?  
a) Sí ( ) b) No ( )

9. ¿Sufre de tiroides o alguna otra enfermedad hormonal?  
a) Si ( ) b) No ( )

Imagen 2. Encuesta

A los pacientes se les extrajo muestras de sangre periférica utilizando una jeringa de 10 ml con aguja calibre 23G x 1", la cual fue posteriormente trasvasada a un tubo vacutainer con tapón lila con EDTA y a dos tubos vacutainer con tapón oro, obteniendo un volumen mínimo de 2 ml por cada tubo (volumen final mínimo de 6 ml). Ambos tipos de tubo fueron agitados con movimientos lentos (entre 5-10) posteriores a la toma de muestra con la finalidad de activar los componentes de cada tubo (anticoagulante en el caso del tubo tapa lila y activador de coagulación para el tubo tapón oro), se rotularon dichos tubos con el folio correspondiente y las letras CH (Citometría Hemática) y PH (Perfil de Hierro) dependiendo el estudio a realizar en cada tubo (CH al tubo lila y PH a los tubos oro).

Las muestras fueron transportadas en condiciones frías en una hielera. A los tubos con tapón lila se les realizó a la brevedad una Citometría Hemática en el equipo Advia 60 de Bayer, las cuales se procesaron dentro de un periodo no mayor a 24 horas posteriores a su obtención (en caso de no poder ser procesadas al momento las muestras fueron mantenidas en refrigeración).

Para comenzar el proceso de las muestras CH el aparato se programa para que realice su proceso de purga y calibración para asegurar una óptima lectura, para dicho fin el aparato realiza varios procesos de lavado de cánulas y realiza una lectura que debe dar valores de cero. Tras dicho proceso de control de calidad se procedió al proceso de las muestras sanguíneas, para lo cual se debió presionar primero el botón ID y teclear el número de folio de la muestra, se colocó la muestra (sin tapón) bajo la cánula y se introdujo lentamente sin que tope con el fondo del tubo. Una vez colocada se presionó el botón situado detrás de la cánula para proceder al aspirado y una vez que este ha terminado, la cánula se levanta sola. Tras retirar la muestra el aparato comenzó a realizar el conteo, lo cual se indica mediante una pequeña luz de color rojo frente a la pantalla. Una vez finalizado el conteo la luz cambia a verde, lo cual indica que se puede proceder con la siguiente muestra. El tiempo aproximado de conteo es de 1 minuto por muestra. Al terminar con todas las muestras el aparato se apagó utilizando el mismo interruptor por el cual se procedió al encendido.

En el caso de los tubos oro, estos fueron centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos para separar el suero del paquete globular y evitar el contacto entre ellos mediante el gel separador contenido en los tubos. Las muestras se sometieron a congelación (no mayor a 1 mes) hasta su uso posterior.

Se utilizaron 4 kits para la determinación de parámetros como hierro sérico, Capacidad Total de Fijación de Transferrina (CTFT) y ferritina. El Índice de Saturación de Transferrina (IST) y la transferrina fueron determinados mediante cálculos basados en otros parámetros obtenidos por turbidimetría.

En el caso de todas las determinaciones séricas se debió descongelar previamente las muestras en refrigeración al menos 24 horas antes de comenzar con el proceso.

Preparación de controles para hierro sérico patológico y normal:

- 1) Templar reactivo.
- 2) Agregar el vial líquido al hidrolizado para reconstituir.
- 3) Agitar suavemente hasta que se disuelva totalmente el hidrolizado evitando la formación de espuma.
- 4) Dejar reposar durante al menos 30 minutos antes de utilizarlo.
- 5) Almacenar entre 2-8°C.

Hierro Total (Pointe):

- 1) Descongelar las muestras e incubar a temperatura ambiente los reactivos durante 30 minutos.
- 2) Encender espectrofotómetro DR-5000 Hach y colocar a una longitud de onda de 560 nm.
- 3) Llevar a lectura de cero utilizando agua destilada como blanco.
- 4) Rotular tubos de vidrio como STD (estándar), MTRA (muestra con su número de folio), CTRLP (control patológico) y CTRLN (control normal).
- 5) Añadir 2.5 ml del reactivo Iron Buffer a cada uno de los tubos.
- 6) Añadir 0.5 ml (500 µl) de muestra o control correspondiente a cada uno de los tubos.
- 7) Leer absorbancia (A1).
- 8) Llevar a lectura de cero utilizando agua destilada como blanco.

- 9) Añadir 0.05 ml (50 µl) del reactivo Iron Color Reagent a todos los tubos.
- 10) Mezclar e incubar a 37°C durante 10 minutos.
- 11) Leer absorbancia (A2).
- 12) Tras las lecturas se deben realizar los cálculos respectivos para obtener la concentración de hierro sérico.  

$$(A2 \text{ MTRA} - A1 \text{ MTRA}/A2 \text{ STD} - A1 \text{ STD}) * 500 \mu\text{g/dL}$$

Valor de referencia= 60- 150 µg/dL

#### Capacidad Total de Fijación de la Transferrina (CTFT Spinreact):

- 1) Descongelar las muestras e incubar a temperatura ambiente los reactivos durante 30 minutos.
- 2) Rotular tubos de vidrio con el número de folio y agregar 0.5 ml (500 µl) de muestra y 1ml del reactivo R5.
- 3) Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 4) Añadir 3 medidas del reactivo R6 a cada tubo.
- 5) Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 6) Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos (usar el sobrenadante como muestra).
- 7) Rotular tubos de vidrio como blanco de muestra (BCORT), estándar (STD), blanco de muestra (BCOMTRA) y muestra (MTRA), estas dos últimas agregando al final el número de folio.
- 8) Pipetear en cada uno de los tubos lo que se indica en la Tabla 2:

Tabla 2. Preparación de muestras para determinación de CTFT

	<b>BCORT</b>	<b>STD</b>	<b>BCOMTRA</b>	<b>MTRA</b>
Reactivo RT ml (R1+R2)	1	1	1	1
R3 gotas	1	1	----	1
Agua µl	200	----	----	----
Patrón µl	----	200	----	----
Muestra µl	----	----	200	200

9) Mezclar e incubar a 37°C durante 5 minutos o a temperatura ambiente durante 10 minutos.

10) Leer absorbancias (color estable durante 30 minutos).

11) Tras las lecturas se deberán realizar los cálculos respectivos para obtener la concentración de CTFT.

$$(\text{Abs MTRA} - \text{Abs BCOMTRA}/\text{Abs STD}) * 100 \mu\text{g/dL} = \text{Hierro}$$

$$\text{Hierro} * 3 = \text{CTFT } \mu\text{g/dL}$$

Valor de referencia: 200-400  $\mu\text{g/dL}$

Ferritina (AccuBind):

Preparación de soluciones:

- Buffer de lavado (Wash Buffer): Diluir el contenido del vial de solución de lavado (wash solution) en 1000 ml de agua destilada o desionizada, almacenar de 2-30°C por no más de 60 días.
- Solución sustrato de trabajo (Working Substrate Solution): Vaciar el contenido del vial ámbar (Solution A) al vial transparente (Solution B) y mezclar. Colocarle la tapa amarilla para una sencilla identificación. Almacenar de 2-8°C.

## PROCEDIMIENTO

1) Descongelar muestras e incubar reactivos a temperatura ambiente durante 30 minutos.

2) Colocar pocillos en microplaca.

3) Añadir a cada pocillo 0.025 ml (25  $\mu\text{l}$ ) de la muestra correspondiente.

4) Añadir 0.1 ml (100  $\mu\text{l}$ ) del reactivo Ferritin Biotin Reagent a cada pocillo.

5) Mezclar suavemente durante 20-30 segundos.

6) Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

7) Decantar y quitar el excedente con un papel absorbente (con golpes fuertes).

- 8) Añadir 0.350 ml (350  $\mu$ l) del Buffer de lavado, decantar y quitar el excedente con un papel absorbente (con golpes fuertes para retirar todo lo que no haya reaccionado).
- 9) Repetir el paso anterior 2 veces más.
- 10) Añadir 0.1 ml (100  $\mu$ l) del reactivo Ferritin Enzyme Conjugate a cada pocillo (no mezclar).
- 11) Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 12) Decantar y quitar excedente con papel absorbente (con golpes fuertes).
- 13) Añadir 0.300 ml (300  $\mu$ l) de Buffer de lavado, decantar y quitar el excedente con papel absorbente (con golpes fuertes para retirar todo lo que no haya reaccionado).
- 14) Repetir el paso anterior 2 veces más.
- 15) Agregar 0.1 ml (100  $\mu$ l) del reactivo Working Substrate Solution (no mezclar).
- 16) Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 17) Añadir 0.05 ml (50  $\mu$ l) del reactivo Stop Solution.
- 18) Mezclar suavemente durante 15-20 segundos.
- 19) Leer absorbancias a 450 nm por duplicado (con 5 minutos de intervalo) utilizando el lector de placas EliRead RT 2100C.

Valores de referencia: Hombres=26-220 ng/ml, Mujeres= 10-124 ng/ml

Procesar como muestras los calibradores del A al F proporcionados por el fabricante para establecer la curva de calibración para ferritina utilizando el programa EXCEL como herramienta donde se podrá establecer el valor de concentración al despejar la fórmula proporcionada por dicho programa. Los datos obtenidos para los valores de los calibradores se muestran en la Tabla 3 y en la Gráfica 1 se muestra la curva de calibración correspondiente.

Tabla 3. Valores de absorbancia y concentración para la curva de calibración de ferritina

Calibrador	Absorbancia	Concentración
1	0.009	0
2	0.190	10
3	0.515	50
4	1.046	150
5	1.992	400

Gráfica 1. Curva de calibración de ferritina



Transferrina:

Este parámetro es obtenido mediante cálculo tras obtener la concentración de CTFT.

La fórmula que se utilizó fue la siguiente:  $CTFT (\mu\text{g/dL}) = \text{Transferrina } (\mu\text{g/dL}) \times 1.25$

Despejando:  $\text{Transferrina } (\mu\text{g/dL}) = CTFT(\mu\text{g/dL}) / 1.25$

Dicha fórmula fue obtenida de Biodiagnostics laboratorio clínico S.C. ISO 15189 (Fares Taie Instituto de análisis, 2010) y Cartas científicas (Medicina Clínica, Barcelona 2006; 126 (13):514-5).

Valores de referencia: Hombres=215-360 mg/dL, Mujeres=245-370 mg/dL.

Índice de Saturación de la Transferrina:

Al igual que la transferrina, este parámetro también fue obtenido mediante cálculo tras obtener las concentraciones de CTFT y hierro sérico.

La fórmula que se utilizó fue la siguiente:  $IST (\%) = (\text{Hierro sérico} / CTFT) \times 100$

Dicha fórmula fue obtenida de Utilidad del receptor soluble de la transferrina para el estudio del déficit de hierro y el diagnóstico diferencial de las anemias ferropénicas adquiridas del adulto, Química clínica 2002; 21(4)267-273.

Valor de referencia= 20-50%

## RESULTADOS

En las Tablas 4, 5 y 6 se muestran los datos obtenidos para las distintas variables analizadas en el procesamiento estadístico. Se realizó muestreo a una población total de 63 pacientes de la tercera edad (a partir de los 60 años de edad), de los cuales 32 (51%) cuentan con diagnóstico de EA y 31 (49%) se encuentran clasificados dentro del grupo control ya que no cuentan con diagnóstico de dicha patología. Del total de los 32 pacientes que cuentan con diagnóstico de EA, 25 (78%) pertenecen al sexo femenino y 7 (22%) al sexo masculino (Tabla 7).

Tabla 4. Pacientes muestreados y resultados obtenidos

Paciente	Grupo	Sexo	Edad	Hierro (60-150 µg/dL)	CTFT (200-400 µg/dL)	Ferritina (M:16-220 ng/ml, F: 10-124 ng/ml)	Transferrina (M: 215-360 mg/dL, F: 245-370 mg/dL)	IST (15-50%)	Hb	CHCM	Diagnostico (años)
001 A	Alzheimer	F	80	61.2	181.0	20.3	144.8	34	13.5	34.3	NS
002 A	Alzheimer	F	80	122.3	367.8	84.9	294.2	33	13.9	35.4	7 a 13
003 A	Alzheimer	F	81	158.2	465.7	128.2	372.6	34	14.7	32.5	7 a 13
004 C	Control	M	88	55.9	173.7	63.4	139.0	32	12.1	32.0	NA
005 C	Control	F	86	224.7	678.7	59.1	543.0	33	13.7	33.6	NA
006 C	Control	M	70	101.1	315.4	224.5	252.3	32	13.7	32.9	NA
007 C	Control	M	75	107.9	281.7	163.9	225.4	38	15.5	34.8	NA
008 C	Control	M	89	43.4	422.6	116.8	338.1	10	17.5	34.0	NA
009 C	Control	F	88	86.8	213.9	230.5	171.1	41	12.5	34.6	NA
010 A	Alzheimer	M	77	361.8	86.9	198.4	69.5	100	14.5	33.2	1 a 6
011 A	Alzheimer	F	70	250.0	187.8	322.2	150.2	100	11.9	34.6	NS
012 A	Alzheimer	F	71	186.8	114.8	86.6	91.8	100	13.2	33.5	1 a 6
013 C	Control	M	88	309.2	114.8	63.9	91.8	100	14.4	34.4	NA
014 A	Alzheimer	M	82	102.6	219.1	72.4	175.3	47	14.3	32.4	1 a 6
015 C	Control	M	85	146.1	232.2	110.3	185.8	63	13.3	31.4	NA
016 C	Control	M	74	51.3	417.4	357.2	338.9	12	11.9	32.9	NA
017 A	Alzheimer	F	71	93.4	208.7	100.5	167.0	45	11.2	34.4	1 a 6
018 A	Alzheimer	F	82	163.2	156.5	110.3	125.2	100	12.1	33.4	7 a 13
019 C	Control	F	94	90.8	211.3	37.0	169.0	43	11.8	33.7	NA
020 A	Alzheimer	F	83	67.1	174.8	131.1	139.8	38	11.0	32.5	1 a 6

Tabla 5. Pacientes muestreados y resultados obtenidos

Paciente	Grupo	Sexo	Edad	Hierro (60-150 µg/dL)	CTFT (200-400 µg/dL)	Ferritina (M:16-220 ng/ml, F: 10-124 ng/ml)	Transferrina (M: 215-360 mg/dL, F: 245-370 mg/dL)	IST (15-50%)	Hb	CHCM	Diagnostico (años)
021 C	Control	M	93	73.7	221.7	182.2	177.4	33	11.1	32.7	NA
022 C	Control	F	76	123.7	323.5	243.9	258.8	38	12.5	30.5	NA
023 C	Control	M	86	147.4	229.6	27.8	183.7	64	12.3	28.5	NA
024 C	Control	F	70	52.6	412.2	46.1	329.8	13	11.5	29.4	NA
025 C	Control	M	79	73.4	219.1	93.4	175.3	34	11.2	32.4	NA
026 C	Control	F	78	57.9	208.7	63.0	167.0	28	12.1	30.6	NA
027 A	Alzheimer	M	83	63.2	200.9	39.3	160.7	31	12.3	31.4	7 a 13
028 A	Alzheimer	F	82	43.4	422.6	37.0	338.1	10	13.9	30.6	7 a 13
029 C	Control	M	72	86.8	245.2	31.1	196.2	35	16.7	32.7	NA
030 A	Alzheimer	M	75	81.6	365.2	20.3	292.2	22	15.6	30.8	1 a 6
031 C	Control	F	87	65.8	166.9	181.1	133.5	39	13.1	30.4	NA
032 C	Control	F	67	56.6	425.2	119.9	340.2	13	11.6	30.8	NA
033 C	Control	F	90	73.7	247.8	237.8	198.2	30	12.0	31.1	NA
034 C	Control	F	60	93.4	229.6	175.5	183.7	41	14.1	30.8	NA
035 C	Control	M	65	42.1	422.6	130.1	338.1	10	13.1	30.6	NA
036 C	Control	M	72	97.2	248.6	211.8	198.9	39	10.4	34.9	NA
037 A	Alzheimer	M	82	283.7	137.1	19.3	109.7	100	12.8	35.1	1 a 6
038 A	Alzheimer	F	84	215.0	141.4	175.1	113.1	100	12.7	34.8	7 a 13
039 A	Alzheimer	F	87	139.9	364.3	103.6	291.4	38	13.5	35.5	1 a 6
040 A	Alzheimer	F	80	173.6	188.6	294.9	150.9	92	15.9	35.3	1 a 6

Tabla 6. Pacientes muestreados y resultados obtenidos

	Paciente	Grupo	Sexo	Edad	Hierro (60-150 µg/dL)	CTFT (200-400 µg/dL)	Ferritina (M:16-220 ng/ml, F: 10-124 ng/ml)	Transferrina (M: 215-360 mg/dL, F: 245-370 mg/dL)	IST (15-50%)	Hb	CHCM	Diagnostico (años)
42	041 A	Alzheimer	F	88	177.5	180.0	307.0	144.0	99	12.3	35.9	1 a 6
43	042 A	Alzheimer	F	61	268.1	162.9	138.6	130.3	100	13.7	35.6	1 a 6
44	043 A	Alzheimer	M	88	203.4	171.4	105.7	137.1	100	12.6	35.6	1 a 6
45	044 C	Control	F	83	117.9	342.9	49.7	274.3	34	14.0	33.2	NA
46	045 A	Alzheimer	F	62	191.7	158.6	87.8	126.9	100	14.9	34.4	1 a 6
47	046 A	Alzheimer	F	80	164.5	154.3	144.5	123.4	100	12.1	35.1	1 a 6
48	047 C	Control	F	76	138.6	334.3	29.7	267.4	41	12.2	35.1	NA
49	048 C	Control	M	82	98.5	244.3	248.0	195.4	40	11.9	35.8	NA
50	049 A	Alzheimer	M	79	115.3	300.0	121.8	240.0	38	16.5	34.3	1 a 6
51	050 C	Control	M	87	58.6	428.6	301.1	342.9	14	11.3	34.7	NA
52	051 A	Alzheimer	F	86	160.6	150.0	195.3	120.0	100	11.4	34.9	1 a 6
53	052 A	Alzheimer	F	88	156.7	132.9	193.6	106.3	100	14.6	34.9	1 a 6
54	053 A	Alzheimer	F	85	181.7	171.4	144.5	137.1	100	13.3	35.3	1 a 6
55	054 A	Alzheimer	F	68	103.6	321.4	102.4	257.1	32	14.7	35.2	1 a 6
56	055 A	Alzheimer	F	87	93.3	342.9	104.7	274.3	27	13.0	34.2	1 a 6
57	056 A	Alzheimer	F	84	134.7	227.1	112.6	181.7	59	12.6	33.6	1 a 6
58	057 C	Control	M	81	66.0	282.9	61.6	226.3	23	14.3	35.6	NA
59	058 A	Alzheimer	F	82	130.8	351.4	200.7	281.1	37	14.7	35.7	1 a 6
60	059 C	Control	F	80	67.4	282.9	64.9	226.3	24	13.8	35.2	NA
61	060 C	Control	F	80	93.3	394.3	66.8	315.4	24	16.1	34.8	NA
62	061 C	Control	F	87	124.4	210.0	245.1	168.0	59	13.7	35.5	NA
63	062 A	Alzheimer	F	71	177.5	175.7	58.0	140.6	100	14.4	34.6	1 a 6
64	063 A	Alzheimer	F	69	82.9	218.6	19.7	174.9	38	15.7	34.5	1 a 6

Tabla 7. Porcentajes y frecuencias por sexo y grupo de estudio

Sexo	Grupo de estudio	
	Alzheimer	Control
Femenino	25 (78%)	15 (48%)
Masculino	7 (22%)	16 (52%)
Total	32	31

Las variables establecidas como punto de comparación entre ambos grupos de estudio, así como la correlación entre los resultados obtenidos para dichas variables y el estadio de la EA en pacientes diagnosticados, a las cuales se les realizó el respectivo manejo estadístico fueron: hierro sérico, ferritina, transferrina, CTFT e IST. Utilizando dichas variables se estableció el porcentaje de los niveles disminuidos, normales y elevados dentro de cada grupo de estudio y por estadio de la enfermedad en los pacientes diagnosticados.

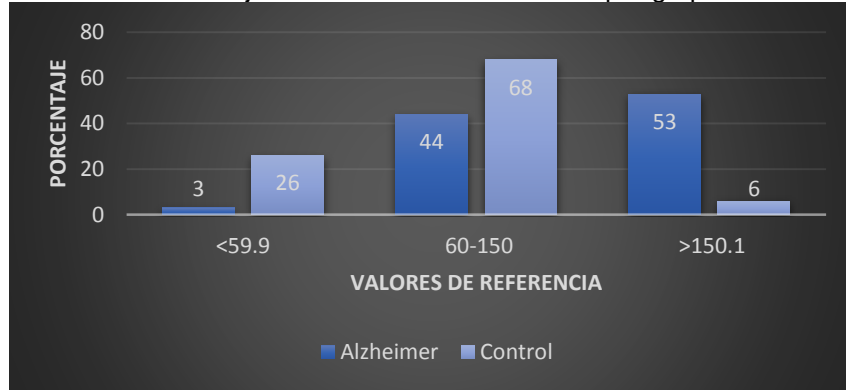
En la Tabla 8 podemos observar los resultados obtenidos tras el manejo estadístico por prueba de chi cuadrada ( $p > 0.05$ ) donde se establecen que las variables que muestran diferencias estadísticamente significativas, tanto para el manejo entre grupos de estudio como entre estadio o grado de avance de la enfermedad, fueron: hierro sérico, CTFT e IST. En cuanto al resto de las variables (ferritina y transferrina), los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 8. Diferencias estadísticamente significativas

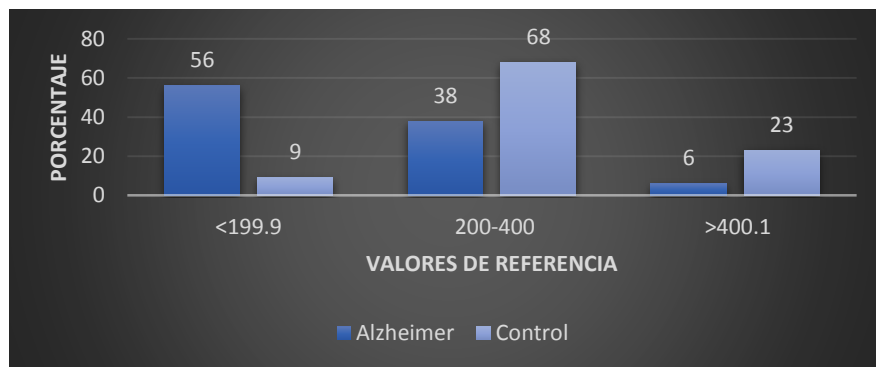
PARAMETROS	EA	CONTROL	ESTADIO 1	ESTADIO 2	p (EA-C)	p (ESTADIO)
Hierro	Alto 53%	Alto 6%	Alto 54%	Alto 50%	<b>0.000</b>	0.104
Ferritina	Alto 41%	Alto 32%	Alto 42%	Alto 33%	0.490	0.687
Transferrina	Bajo 74%	Bajo 55%	Bajo 81%	Bajo 51%	0.225	0.067
CTFT	Bajo 56%	Bajo 9%	Bajo 62%	Bajo 33%	<b>0.000</b>	<b>0.009</b>
IST	Alto 53%	Alto 20%	Alto 58%	Alto 33%	<b>0.001</b>	0.084

En las Gráficas 3, 4 y 5 se representan los porcentajes de las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas, con la finalidad de establecer una diferencia visual entre ambos grupos de estudio.

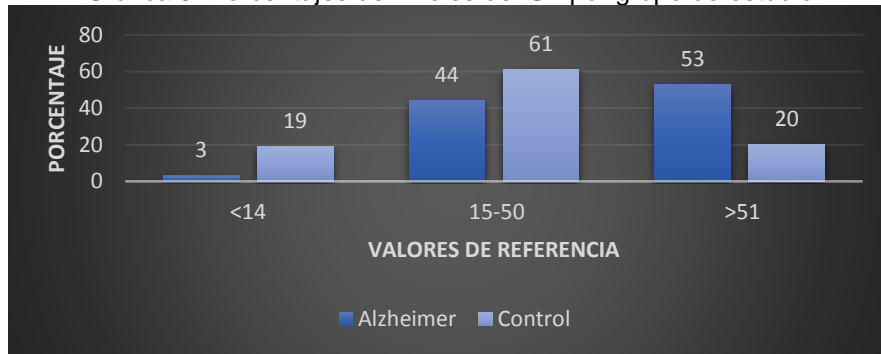
Gráfica 3. Porcentajes de niveles de hierro sérico por grupo de estudio



Gráfica 4. Porcentajes de niveles de CTFT por grupo de estudio



Gráfica 5. Porcentajes de niveles de IST por grupo de estudio



Los resultados obtenidos para las variables que muestran diferencias estadísticamente significativas apoyan nuestra hipótesis de relación entre alteraciones en el metabolismo de hierro y el desarrollo de la EA.

Observando los porcentajes obtenidos para cada una de las variables en cuanto a los grupos EA y control, estos coinciden con los rangos teóricos que se esperaban obtener con excepción de la variable ferritina. Hierro sérico (53% EA, 6% C), IST (53% EA, 20% C) y ferritina (59% EA, 68% C) elevados, CTFT (56% EA, 9% C) y transferrina (74% EA, 55% C) disminuidos.

La observación de niveles elevados de hierro sérico es compatible con otros estudios realizados anteriormente donde se encontraron niveles elevados de otros metales como cobre y aluminio en pacientes diagnosticados con EA.

En los estudios realizados en el INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata) en Argentina por Arnal en el 2010 y Cristalli en el 2012 (en colaboración con el Dr. en Bioquímica Clínica Carlos Alberto Marra), gracias a los resultados obtenidos por sus respectivas investigaciones, lograron establecer una relación directa entre los niveles elevados de cobre libre y el desarrollo de la EA. Estos niveles elevados de cobre se pueden ver acompañados de otros metales como, en este caso, el hierro y ante la presencia alterada de los mismos se producen una serie de alteraciones biológicas que producirán daños a nivel molecular, celular y tisular que llevarán al desarrollo de la sintomatología y características típicas de la EA que ya fueron mencionadas con anterioridad en las secciones de planteamiento del problema y justificación de este documento.

Además de los estudios realizados en Argentina, la investigación que se realizó en España entre los años 1994 y 1995 en un estudio de casos y controles pero con pacientes con Enfermedad de Parkinson por Rosa Larumbe en el Centro de Investigaciones Biomédicas del Servicio Navarro de Salud, aun cuando los niveles de todas las variables analizadas se obtuvieron dentro de rangos normales, las variables de transferrina y ferritina mostraron tendencia a la elevación, con los cuales no se descartó la posibilidad de encontrar alteraciones en investigaciones futuras, tal como nos ocurrió a nosotros en el desarrollo de este estudio.

De la misma manera en la investigación realizada por la Maestra en Toxicología Analítica Fernanda Jiménez en Venezuela en el 2014, en un estudio de casos y controles con EA a un total de 34 pacientes (22 con EA y 12 control), los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos pero se observó una clara tendencia hacia la elevación en los pacientes con diagnóstico y no se descartó la probabilidad de encontrar una correlación entre los niveles séricos de aluminio y el desarrollo de la EA.

Es claro que todas estas evidencias documentan una relación real y directa entre las alteraciones bioquímicas que desembocan en una desestabilización del metabolismo de diversos metales (incluido el hierro), dando como resultado una respuesta del organismo que culminará con daños celulares y tisulares ante las condiciones de hostilidad que se producen por tales alteraciones. Ante la respuesta programada del organismo se produce la generación de ERO que inducirán a la célula a la apoptosis y producirá un daño progresivo e irreversible en el cerebro, que llevarán a la persona afectada a la pérdida progresiva de habilidades cognitivas y motoras que a su vez contribuirán al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la demencia, la Enfermedad de Parkinson y el EA, tal como argumentan James A. Duce, Ivana De Domenico, Yves Christen, Claudia Martínez, entre otros investigadores en sus respectivos trabajos.

Además de revisar la correlación de las variables estudiadas entre ambos grupos de estudio, se verificó la correlación de dichas variables y el grado de avance o estadio de la enfermedad. En este caso se establecieron tres estadios agrupados por el tiempo que tenía el paciente de haber sido diagnosticado con la EA. El primer

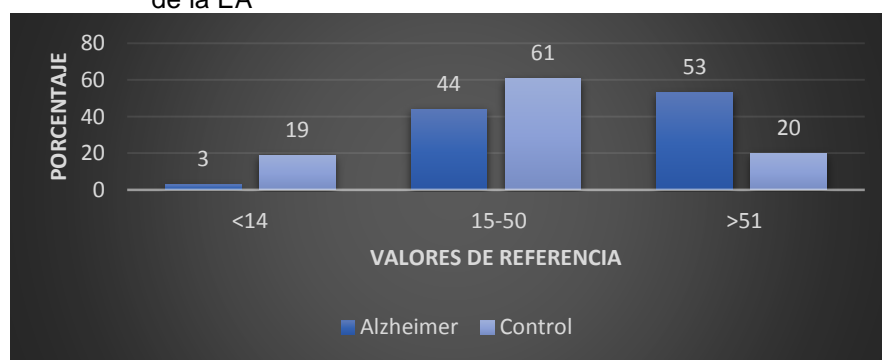
grupo contaba con un tiempo de diagnóstico de 1 a 6 años fueron agrupados dentro del estadio 1, el segundo grupo contaba con un tiempo de diagnóstico de 7 a 13 años fueron agrupados dentro del estadio 2 y en el tercer grupo se agruparían los pacientes que hubiesen sido diagnosticados con un tiempo de entre 14 a 20 años. No se estableció una temporalidad mayor a 20 años de diagnóstico de la enfermedad ya que, según la bibliografía consultada, una vez que la enfermedad es diagnosticada se pone en marcha una especie de “cuenta regresiva” en cuanto al progreso de la patología que conduce al paciente afectado a la muerte en una temporalidad aproximada de 20 años.

En el caso particular de este estudio, solamente se contó con pacientes pertenecientes a los primeros 2 estadios de la enfermedad.

En la Tabla 8 se encuentran los resultados obtenidos donde es posible observar que solo hay diferencia estadísticamente significativa para la variable CTFT. En lo que respecta al resto de las variables (hierro sérico, IST, transferrina y ferritina), los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas.

En las Gráficas 6 se representan los porcentajes del IST el cual mostro diferencias estadísticamente significativas, con la finalidad de establecer una diferencia visual entre los estadios de la EA a los cuales pertenecían los pacientes con diagnóstico.

Gráfica 6. Porcentajes de niveles de IST por grado de avance o estadio de la EA



En el caso de los resultados obtenidos para estas variables por estadio o grado de avance de la enfermedad no se cumplió con el perfil sugerido de alteración, ya que se esperaba encontrar un perfil similar al anteriormente planteado pero no se logró establecer un patrón constante de alteración. En el estadio inicial se esperaban

valores dentro de rangos normales o ligeramente elevados para hierro sérico, IST y ferritina, pero disminuidos o normales para CTFT y transferrina. En cuanto a estadios más avanzados se esperaba encontrar una elevación considerable en los niveles de ferritina e IST, hierro sérico y CTFT en niveles normales y transferrina en rangos de disminuidos a normales.

Para poder otorgarle al paciente un reporte de resultados más completos, se incluyó en el paquete de estudios realizados una serie de parámetros, denominados en conjunto Citometría Hemática (CH). Este conjunto de parámetros incluyen: hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) , índice de densidad eritrocitaria (IDE), eritrocitos, leucocitos, diferencial de células leucocitarias (granulocitos, linfocitos y monocitos), plaquetas e índice de densidad plaquetaria (IDE).

Por último, solamente es importante mencionar que durante la realización del estudio una cantidad importante de pacientes resulto con anemia (70%) de los cuales la mayoría eran tratados con suplementos de hierro pero del total de la muestra poblacional aproximadamente el 59% tenían niveles elevados de hierro sérico. Este hallazgo les fue de utilidad a los médicos encargados de los asilos involucrados ya que decidieron suspender los tratamientos con hierro para estos pacientes. También se debe resaltar el hecho de que la mayor parte del grupo participante diagnosticado con EA pertenecía al género femenino, lo cual nos muestra que tal vez si exista una relación o factor predisponente entre el género y el desarrollo de la enfermedad que aún no ha sido determinado.

## CONCLUSIONES

---

Las alteraciones en el metabolismo de hierro son un factor de riesgo en la evolución clínica de pacientes diagnosticados con EA.

Fue posible obtener el perfil esperado en pacientes con EA en comparación al grupo control, donde los niveles de hierro sérico e IST se encontraron elevados y los niveles de CTFT y transferrina disminuidos.

Se comprobó que existen diferencias estadísticamente significativas para las variables hierro sérico, IST y CTFT al comparar la población de pacientes con diagnóstico de EA con respecto al grupo control, lo cual demuestra la clara evidencia de incremento en el hierro de reserva en los pacientes con EA.

Dadas las evidencias obtenidas durante el desarrollo del proyecto se proponen estos parámetros como herramientas diagnósticas complementarias para comprobar el incremento en el hierro de reserva en pacientes con EA, con la ventaja de que son sencillos de determinar y tienen un costo accesible.

En el caso particular de los pacientes con EA por estadio se observa el perfil esperado para ambos estadios, donde se encuentran niveles elevados de hierro sérico e IST y disminuidos en el caso de la transferrina y la CTFT.

La CTFT es un estudio sencillo y accesible que puede proporcionar un panorama general del grado de avance de la EA, es decir que con este estudio no solamente se puede determinar si el paciente sufre la enfermedad sino también que tan desarrollada se encuentra.

En este estudio preliminar, se contó con una muestra poblacional pequeña (n=63) por lo que es importante realizar un estudio similar con una muestra poblacional mayor para reafirmar la relación entre dichas alteraciones y la evolución clínica de la EA. Además se debe incluir un grupo más homogéneo en cuanto al género para poder relacionarlo con el desarrollo de la EA y determinar si el sexo es un factor predisponente.

De igual manera es aconsejable realizar estudios prospectivos de seguimiento a los pacientes con EA donde se incluyan variables como: tratamiento farmacológico, alimentación y estado de salud general.

Se sugiere la posibilidad de utilizar las pruebas bioquímicas en las cuales se mostraron diferencias estadísticamente significativas (hierro sérico, IST y CTFT) como complemento a los estudios psicológicos diferenciales de demencia rutinarios para establecer un diagnóstico más confiable.

Debemos tomar en cuenta que a una gran cantidad de casos diagnosticados de EA, tras realizarles estudios moleculares en busca de las mutaciones conocidas de la enfermedad, no se les diagnostican mutaciones asociadas y no cuentan con antecedentes familiares de EA.

Por dicho motivo no podemos descartar la posibilidad de encontrar más evidencias que apoyen los resultados obtenidos en este estudio acerca de la relación del acumulo férrico y la EA, este es solo el comienzo de una línea de investigación en la búsqueda de nuevos blancos de diagnóstico certeros, confiables y económicos para que se les proporcione a los pacientes el tratamiento adecuado y de esta manera detener el progreso de esta terrible y devastadora patología.

## REFERENCIAS

---

Abboud S, Haile DJJ. A novel mammalian iron-regulation protein involved in intracellular iron metabolism. *Biol Chem* 2000; 275(26): 19906- 19912.

Acosta D, Brusco L, Fuentes P, et. al., La enfermedad de Alzheimer diagnóstico y tratamiento: una perspectiva latinoamericana, Editorial médica Panamericana, 2012.

Alzheimer A, Über eine eigenartige Erikrankung der Hirnrinde [About a peculiar disease of the cerebral cortex] [Acerca de una peculiar enfermedad de la corteza cerebral.]. *Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin* 1907; 64 (1–2): 146–148.

Arnal N, Cristalli DO, Alaniz MJT de, Marra CA. Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Res* 2010; 1319: 118-30.

Bergón E, Miranda I, Bergón M, et. al., Utilidad del receptor soluble de la transferrina para el estudio del déficit de hierro y el diagnóstico diferencial de las anemias ferropénicas adquiridas del adulto, *Química clínica* 2002;21(4)267-273.

Berrios G, Alzheimer's disease: a conceptual history *Int. J. Ger. Psychiatry*, 1990; 5: 355–365.

Behrens M y Vergara F, Cien años de la enfermedad de Alzheimer. La inmunoterapia ¿una esperanza?; *Rev Méd Chile* 2007; 135: 103-110

Brissot P, Bardou-Jacquet E, Bérengère T, et. al., Molecular diagnosis of genetic iron-overload disorders. *Expert Review of Molecular Diagnosis* 2010; 10(6): 755-763.

Cartas científicas (Medicina Clínica, Barcelona 2006; 126(13):514-5).

Christen Y, Oxidative stress and Alzheimer Disease, American Society for Clinical Nutrition 2000; 71(suppl):621S-9S.

Casseus L, De Camp F, Videla F, et. al., Causa de muerte 2008.

Cristalli D, Arnal N, Marra F, et. al., Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. J Neurol Sci 2012; 314 (1-2): 48-56.

Del Castillo R, López-Herce C, De Portugal A, Diagnóstico clínico: manifestaciones precozes, procesos relacionados y formas atípicas, Análisis de medicina interna 2002; 19(5): 251-256.

De Domenico I, McVye D, Bonaccorsi M, et. al., Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin, The EMBO Journal (2007) 26, 2823–2831.

Dong X, Gao W, Kong W, et. al., Neuroprotective effect of the active components of three chinese herbs on brain iron load in a mouse model of Alzheimer's Disease, Experimental and therapeutic medicine 2015; 9: 1319-1327.

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et. al., Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter, Nature 2000; 403(6771): 776-781.

Du F, Qian ZM, Luo Q, et. al., Hepcidin Suppresses Brain Iron Accumulation by Downregulating Iron Transport Proteins in Iron-Overloaded Rats, Molecular Neurobiology 2014; DOI 10.1007/s12035-014-8847-x.

Duce J, Tsatsanis A, Cater M, et. al., Iron-Export Ferroxidase Activity of b- Amyloid Precursor Protein Is Inhibited by Zinc in Alzheimer's Disease, Cell 2010; 142, 857–867,

Ezquer F, Nuñez T, Rojas A, et. al., Hereditary hemochromatosis: An opportunity for gene therapy, Biol Res 2006; 39: 113-124.

Fang D, Zhong-Ming Q, Qianqian L, et. al., Heparin Suppresses Brain Iron Accumulation by Downregulating Iron Transport in Iron-Overloaded Rats, *Mol Neurobiol* 2014; DOI 10.1007/s12035-014-8847-x

Fountaine S, Sabbagh J, Baker J, et. al., Cellular factor modulating the mechanism of tau protein aggregation, *Cell. Moll. Life Sci.* 2015; 10: DOI 10.1007/s00018-015-1839-9.

García T y Jay D; Fosforilación de Tau y enfermedad de Alzheimer; *Gac Méd Méx* 2004; 140(3): 330-335.

Lerín M et.al., Día a día con la enfermedad de Alzheimer, Alfaomega Grupo Editor, México, 2013.

Martinez C, Vargas C y Arancibia S, Estrés oxidativo y neurodegeneración, *Rev Fac Med UNAM* 2003; 46(6): 229-235.

Marra C y Tacconi M, Biomarcadores emergentes para diferentes patologías humanas, *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 2013; 47 (2): 363-76.

McCarthy R y Kosman D, Ferroportin and Exocytosomal Ferroxidase Activity Are Required for Brain Microvascular Endothelial Cell Iron Efflux, *The journal of biological chemistry* 2013, 288(24): 17932–17940.

McKie A, Marciani P, Ralfs A, et. al., A novel duodenal iron-regulated transporter IREG 1 implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation, *Mol. Cell.* 2000; 5(2): 299-309.

Myron W y Lipton A, Demencias: Investigación, diagnóstico y tratamiento, Masson S.A., Barcelona (España), 2005.

Myron W y Lipton A, Manual de Enfermedad de Alzheimer y otras demencias, Editorial médica panamericana, Madrid (España), 2010.

Nemeth E, Tuttle M, Powelson J, et. al., Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization, *Science* 2004; 306(5704): 2040-2043.

Páez C, Cioccia A, Hevia P, et. al., Papel de la Heparina y la ferroportina en la regulación hormonal de la homeostasis del hierro, *academia biomédica digital*, sept. 2014, no 59.

Raha A, Vishnav R, Friedland R, et. al., The systemic iron-regulatory proteins hepcidin and ferroportin are reduced in the brain in Alzheimer's Disease; *Acta Neuropathologica Communications* 2013, 1:55

Robles A, Del Ser T, Peña-Casanova J, et. al., Propuesta de criterios para el diagnóstico clínico del deterioro cognitivo ligero, la demencia y la enfermedad de Alzheimer, *Neurología* 2002; 17(1):17-32

Romano M, Nissen M, Huerto N, et. al., Enfermedad de Alzheimer, *Revista de posgrado de la 6ta. Cátedra de medicina* 2007; 175:9-12.

Ruiz J, 100 años de enfermedad de Alzheimer. Alois Alzheimer: Su vida y obra, *Historia de la enfermedad de Alzheimer; Alzheimer. Real Invest.Demenc.*2007; 35: 12-22.