

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICO CLÍNICO

**“GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E
MEDIANTE PCR CONVENCIONAL EN PACIENTES CON
DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER, ATENDIDOS EN INSTITUCIONES GERIÁTRICAS DE
LA CIUDAD DE QUITO, DE MAYO A DICIEMBRE DEL 2012”**

ANDRÉS ALEJANDRO SARMIENTO DELGADO

DIRECTORA: DRA. INÉS ECHEVERRÍA

QUITO, 2014

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, ANDRÉS ALEJANDRO SARMIENTO DELGADO, con C.I 1721070355, autor del trabajo de graduación titulado “GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E MEDIANTE PCR CONVENCIONAL EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, ATENDIDOS EN INSTITUCIONES GERIÁTRICAS DE LA CIUDAD DE QUITO, DE MAYO A DICIEMBRE DEL 2012”, previa a la obtención de grado académico de BIOQUÍMICO CLÍNICO en la Escuela de Bioanálisis.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en forma digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la universidad.

Quito, 2014

Andrés Alejandro Sarmiento Delgado

C.I. 172107035-5

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas que me han acompañado a lo largo de mi carrera, mi formación y mi vida, que intentaré encontrar las palabras justas para nombrarlas agradeciendo todo el apoyo que me han brindado.

En primer lugar he de agradecer a Dios por haberme permitido llegar hasta donde he llegado ahora, por darme su bendición durante mi vida y especialmente durante toda la carrera, tanto a nivel personal como profesional.

Quiero agradecer a mi familia, a mi papá, a mi mamá y a mis hermanos, por ser mi constante motivación para superarme en todos los aspectos durante el transcurso de mi vida.

Seguidamente, quiero agradecer al Dr. Rolando Avilés, autor del proyecto de investigación, por haberme escogido para participar en el mismo dándome un voto de confianza al brindarme la oportunidad de llevarlo a cabo.

Un agradecimiento muy especial y cariñoso es el que quiero dirigir a la Dra. Inés Echeverría, mi directora de tesis, a quien pude recurrir en todo momento y de quien siempre obtuve todo el apoyo y ayuda posible antes, durante y después del trabajo.

Asimismo quiero agradecer de forma muy afectiva a la Máster Sandra Andrade por ofrecerme su apoyo, ayuda incondicional y especialmente por su amistad durante toda mi carrera.

Un agradecimiento muy especial para el Lcdo. Fabricio Paredes, con quien trabajamos en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Bioanálisis, por brindarme su apoyo absoluto durante la realización del estudio.

Quiero también agradecer a las personas que siempre me facilitaron su ayuda ilimitada y desinteresada al responder todas mis inquietudes durante el desarrollo del trabajo, por su cordialidad y su total gentileza: Lcda. Lucía Ulloa, Dr. Santiago Escalante, Lcdo. Eduardo Villacis, Lcdo. Andrés Zabala, Ing. Andrea Zambrano, MSc. Anita Troya, MSc. Rosita Chiriboga, y Lcda. Delia Sosa.

Finalmente quiero agradecer a todos los miembros de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, tanto autoridades, personal docente, trabajadores, amigos y compañeros estudiantes, Leslie y Andrea por la acogida que me brindaron, ofreciéndome en cada momento su ayuda y orientación para culminar con éxito mis estudios.

Muchas gracias a los directivos, al personal médico y a los pacientes de los Hospitales, de los Hogares de ancianos y de las Instituciones de Salud en general por su apoyo para para permitirme desarrollar el presente estudio sobre la EA.

A ti Emilia Silva.

Andrés Sarmiento.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Tablas.....	vii
Gráficas.....	viii
Figuras.....	ix
Esquemas.....	xi
Abreviaturas.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xiv

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	7
1.1.1 Objetivo general.....	7
1.1.2 Objetivos específicos.....	7

CAPÍTULO II

LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	8
2.1 Antecedentes.....	8
2.2 Marco teórico.....	9
2.2.1 Generalidades de la enfermedad de Alzheimer.....	9
2.2.2 Aspectos clínicos de la EA.....	9
2.2.3 Desórdenes cognitivos en la EA.....	9
2.2.4 Desórdenes emocionales en la EA.....	9
2.2.5 Fisiopatología de la EA.....	11
2.2.6 Formación de placas seniles ovillos neurofibrilares en la EA.....	11
2.2.7 Factores de riesgo en la EA.....	13
2.2.8 Genética de la EA.....	13
2.2.9 La Apolipoproteína-E y la EA.....	14
2.2.10 Diagnóstico de la EA.....	15
2.3 Marco Conceptual.....	16

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO.....	18
3.1 Tipo de estudio.....	18
3.2 Población y muestra.....	18
3.3 Tamaño muestral y muestreo.....	19
3.4 Criterios de selección de la muestra.....	19
3.4.1 Criterios de inclusión.....	19
3.4.2 Criterios de exclusión.....	20
3.5 Recopilación de datos.....	20
3.6 Procedimientos de Laboratorio.....	20
3.6.1 Toma de muestra.....	21
3.7 Metodología del estudio.....	21
3.8 Equipos, materiales y reactivos.....	22
3.9 Métodos y técnicas empleadas.....	23
3.9.1 Extracción del ADN.....	23
3.9.2 Cuantificación del ADN.....	25
3.9.3 Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	30
3.9.3.1 Procedimiento PCR.....	32
3.9.3.2 Amplificación del gen <i>APO-E</i>	36
3.9.3.3 Amplificación del gen control de β -actina.....	37
3.9.4 Electroforesis.....	39
3.9.5 Digestión enzimática.....	40
3.9.5.1 Procedimiento Digestión.....	42
3.10 Control de calidad.....	43
3.11 Análisis de la información.....	44
3.12 Operacionalización de la investigación.....	45

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS.....	66
4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA.....	66
4.2 RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE ADN.....	68
4.3 RESULTADOS DE LA PCR.....	69
4.4 RESULTADOS DE LA DIGESTIÓN.....	71
5. DISCUSIÓN.....	78

6. CONCLUSIONES.....	82
7. RECOMENDACIONES.....	85
8. ANEXOS.....	87
8.1 Anexo 1. Formulario de recolección de datos de pacientes.....	87
8.2 Anexo 2. Formulario consentimiento informado.....	89
9. BIBLIOGRAFÍA.....	90

TABLAS

	Pág.
TABLA 3.1 Mix utilizada para la realización de la PCR para el gen <i>APO-E</i> con un volumen final de 25 μ l.....	36
TABLA 3.2 Programación de temperaturas en el termociclador para el gen <i>APO-E</i> en cada una de las etapas de la PCR.....	37
TABLA 3.3 Mix utilizada para la realización de la PCR para el gen control de β -actina.....	38
TABLA 3.4 Programación de temperaturas en el termociclador para el gel control de β -actina en cada una de las etapas de la PCR.....	38
TABLA 3.5 Nomenclatura de la enzima de restricción <i>Hha-I</i>	41
TABLA 3.6 Mix utilizada en la digestión enzimática para los fragmentos correspondientes al gen <i>APO-E</i> con un volumen final de 20 μ l.....	43
TABLA 4.7 Frecuencia de pacientes seleccionados por hospital.....	67
TABLA 4.8 Frecuencia de pacientes seleccionados por hogar de ancianos.....	67
TABLA 4.9 Estadísticas descriptivas de la población estudiada.....	68
TABLA 4.10 Frecuencias genotípicas encontradas según el polimorfismo del gen <i>APO-E</i> en hombres y mujeres.....	73
TABLA 4.11 Frecuencias de pacientes portadores del alelo ϵ 4 del gen <i>APO-E</i>	74
TABLA 4.12 Frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen <i>APO-E</i> en hombres y mujeres con diagnóstico presuntivo de la EA.....	75
TABLA 4.13 Frecuencias de discapacidades y promedio de concentración de colesterol sanguíneo y años de educación de acuerdo al alelo presente en el gen <i>APO-E</i> en pacientes con EA.....	76

GRÁFICAS

Pág.

GRÁFICA 4.1 Frecuencia por rango de edad de los pacientes en estudio.....	67
GRÁFICA 4.2 Valores obtenidos en la cuantificación de ADN de las muestras analizadas en el fluorómetro QUBIT 2.0.....	69
GRÁFICA 4.3 Distribución esquemática de las frecuencias genotípicas encontradas de los polimorfismos del gen <i>APO-E</i> en la población estudiada.....	74
GRÁFICA 4.4 Número de pacientes que presentan el alelo $\epsilon 4$ del gen <i>APO-E</i> por rango de edad.....	75
GRÁFICA 4.5 Frecuencias alélicas del polimorfismo del gen <i>APO-E</i>	76

FIGURAS

	Pág.
FIGURA 3.1 Método de extracción de ADN mediante el kit <i>DNA PURELINK GENOMIC-INVITROGEN</i>	25
FIGURA 3.2 Protocolo de trabajo para preparación de soluciones estándar previo a la cuantificación de ADN en el fluorómetro QUBIT [®] 2.0.....	26
FIGURA 3.3 Fluorómetro QUBIT [®] 2.0: Parámetros de cuantificación para ensayos en ADN, ARN y proteínas.....	27
FIGURA 3.4 Fluorómetro QUBIT [®] 2.0: Lectura de las soluciones estándar para la calibración del equipo previo a la lectura de las muestras.....	28
FIGURA 3.5 Fluorómetro QUBIT [®] 2.0: Curva de calibración <i>fluorescencia vs concentración</i> de las soluciones estándar previo a la lectura de las muestras.....	28
FIGURA 3.6 Fluorómetro QUBIT [®] 2.0: Lectura de las muestras en el equipo (<i>concentración en ng/ml</i>).....	29
FIGURA 3.7 Fluorómetro QUBIT [®] 2.0: Almacenamiento de la información obtenida (<i>concentración de las muestras</i>) en el dispositivo USB incorporado en el equipo.....	29
FIGURA 3.8 Etapas de la PCR: A. <i>Desnaturalización</i> (separación de la doble hebra de ADN mediante calentamiento), B. <i>Hibridación</i> de los <i>primers</i> en regiones específicas, y C. <i>Elongación</i> (extensión de los primers por la síntesis de ADN mediada por la Taq polimerasa).....	32
FIGURA 3.9 Secuencia del gen <i>APO-E</i>	33
FIGURA 3.10 Búsqueda de los <i>primers</i> para el gen <i>APO-E</i>	33
FIGURA 3.11 Alineamiento de la secuencias para el gen <i>APO-E</i>	33
FIGURA 3.12 Secuencia del gen β -actina.....	35
FIGURA 3.13 Búsqueda de los <i>primers</i> para el gen de la β -actina.....	35
FIGURA 3.14 Control del par de <i>primers</i> para el gen de β -actina.....	36
FIGURA 3.15 Corte específico de la hebra de ADN mediado por la enzima de restricción.....	41
FIGURA 4.16 Amplificación del gen <i>APO-E</i> en gel de agarosa al 2%.....	70
FIGURA 4.17 Amplificación del gen <i>APO-E</i> en gel de agarosa al 2% (duplicado).....	71
FIGURA 4.18 Visualización de polimorfismos del gen <i>APO-E</i> mediante restricción enzimática en gel de agarosa al 4%.....	72

FIGURA 4.19 Visualización de polimorfismos del gen *APO-E* mediante restricción enzimática en gel de agarosa al 4% (2).....72

FIGURA 4.20 Patrones electroforéticos esperados para los diferentes genotipos derivados de los alelos más comunes del gen *APO-E* ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$).....73

ESQUEMAS

	Pág.
ESQUEMA 4.1 Distribución y volumen de las muestras en gel de agarosa para la amplificación del gen <i>APO-E</i>	70

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
Apo-E:	Apolipoproteína E
β-actina:	Beta actina
βAPP:	Proteína precursora de beta amiloide
dNTP:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EA:	Enfermedad de Alzheimer
EDTA:	Ácido etilen diamino tetra acético
NCBI:	Centro Nacional de Información Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
PHFs:	Filamentos pareados helicoidales
PPA:	Proteína precursora amiloide
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RFLP:	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
RT-PCR:	PCR en tiempo real (<i>Real Time PCR</i>)
TBE:	Tris borato EDTA

RESUMEN

“GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E MEDIANTE PCR CONVENCIONAL EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, ATENDIDOS EN INSTITUCIONES GERIÁTRICAS DE LA CIUDAD DE QUITO, DE MAYO A DICIEMBRE DEL 2012”

INTRODUCCIÓN: La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia entre los adultos mayores a nivel mundial. Esta patología genera un deterioro paulatino de las funciones cognitivas y mentales por su carácter neurodegenerativo, progresivo e irreversible. La EA puede ser de tipo familiar (inicio temprano) o esporádico (inicio tardío). Diversos factores genéticos de susceptibilidad para la enfermedad de Alzheimer han sido propuestos, siendo el alelo $\epsilon 4$ del gen *APO-E* el mayor factor de riesgo para la variante tardía de la patología.

OBJETIVOS: En el presente estudio se evaluó la frecuencia genotípica y alélica del gen *APO-E* mediante la determinación de sus polimorfismos genéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se realizó el análisis del genotipo del gen *APO-E* en 100 individuos con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer (36 varones y 64 mujeres), atendidos en diferentes instituciones de salud y residentes de la ciudad de Quito. *Extracción de ADN:* La muestra se obtuvo a partir de sangre periférica mediante protocolos específicos empleando el kit de extracción de la casa Invitrogen. *PCR:* A partir de ADN genómico se amplificó la región de 259 pares de bases correspondiente a la región variable de la Apo-E mediante cebadores específicos. *RFLP:* La presencia de los diferentes alelos se determinó mediante restricción con la enzima *Hha-I* y se realizó la detección de los fragmentos resultantes mediante electroforesis en gel de agarosa al 4 % para posteriormente ser observados en el transiluminador UV.

RESULTADOS: Se encontraron 4 de los 6 genotipos posibles en las muestras analizadas: $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, y la ausencia de los homocigotos $\epsilon 2/\epsilon 2$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$. El genotipo más frecuente fue $\epsilon 3/\epsilon 3$ (83 %), seguido de $\epsilon 3/\epsilon 4$ (9 %), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (7 %) y $\epsilon 2/\epsilon 3$ (1 %). El alelo $\epsilon 3$ es el más frecuente (88 %) en sus formas homocigota y heterocigota, mientras que los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$ confieren una frecuencia mucho menor (4 % y 8 % respectivamente) en la población estudiada.

CONCLUSIONES: Las frecuencias alélicas del gen *APO-E* encontradas establecen que el alelo $\epsilon 3$ es el más frecuente en la población estudiada, mientras que los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$ confieren una frecuencia mucho menor. De acuerdo a las frecuencias obtenidas en la población estudiada se concluye que el alelo $\epsilon 4$ del gen de la Apolipoproteína E puede ser considerado un factor de susceptibilidad que incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en su variante tardía, sin embargo no es una causa, puesto que muchos pacientes homocigotos y heterocigotos para los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ presentan la patología sin tener ningún alelo de tipo $\epsilon 4$, lo que sugiere que otros factores genéticos y ambientales probablemente estén implicados en el desarrollo de la EA. Los hallazgos obtenidos abren un precedente para que en el Ecuador se realicen futuros estudios con el fin de clarificar la asociación entre el alelo $\epsilon 4$ y la EA en la población ecuatoriana.

PALABRAS CLAVE: enfermedad de Alzheimer, polimorfismos, Apolipoproteína E, genotipificación, alelos, factor de riesgo.

ABSTRACT

"GENOTYPING OF APOLIPOPROTEIN-E GENE BY CONVENTIONAL PCR IN PATIENTS WITH PRESUMPTIVE DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE, TREATED AT DIFFERENT HEALTH INSTITUTIONS OF QUITO-ECUADOR, FROM MAY TO DECEMBER 2012"

INTRODUCTION: Alzheimer's disease is the commonest cause of dementia in elderly people around the world. This pathology generates a gradual deterioration of cognitive and mental functions due to its neurodegenerative, progressive and irreversible character. Alzheimer's disease can be classified as familial or sporadic. Many susceptibility genetic factors for AD have been proposed, showing that Apo-E's $\epsilon 4$ allele is considered a major risk factor for late onset Alzheimer's disease.

OBJECTIVES: To evaluate genotypic and allelic frequencies of *APO-E* gene by determining their genetic polymorphisms.

MATERIALS & METHODS: An analysis of *APO-E* gene's genotype was performed in 100 individuals with presumptive diagnosis of Alzheimer's disease (36 men and 64 women) treated at different health institutions of Quito's city. *DNA extraction:* Samples were obtained from peripheral blood by specific protocols using an extraction kit (Invitrogen). *PCR:* A specific region of 259 bp of the *APO-E* gene was amplified from genomic DNA using specific primers. *RFLP:* The presence of different alleles was determined by restriction with *Hha-I* enzyme and resulting fragments were detected by electrophoresis in agarose gel at 4 % and observed with a UV transilluminator.

RESULTS: Four of six possible genotypes were found in all the samples: $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, and absence of $\epsilon 2/\epsilon 2$ and $\epsilon 4/\epsilon 4$ homozygotes. The most frequent genotype was $\epsilon 3/\epsilon 3$ (83 %), followed by $\epsilon 3/\epsilon 4$ (9 %), $\epsilon 2/\epsilon 4$ (7 %) and $\epsilon 2/\epsilon 3$ (1 %). The $\epsilon 3$ allele is the most frequent (88 %) homozygous and heterozygous forms, while the $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ alleles confer a much lower frequency (4 % and 8 % respectively) in the study population.

CONCLUSIONS: The Apo-E allele frequencies found showed that the $\epsilon 3$ allele is the most prevalent in the study population, while $\epsilon 2$ and $\epsilon 4$ alleles confer a lower frequency, so we cannot determine the exact effect of $\epsilon 4$ allele in patients with presumptive diagnosis of developing Alzheimer's disease. According to the frequencies obtained in the study population we concluded that $\epsilon 4$ allele of the apolipoprotein E gene can be considered a susceptibility factor that increases the risk of developing Alzheimer's disease in late variant, but it is not a cause, due to many homozygous and heterozygous patients exhibit pathology without any type allele $\epsilon 4$, which suggests that other genetic and environmental factors are probably involved in the development of AD. The findings suggest a preamble to investigate in the future for clarifying the association between the $\epsilon 4$ allele and AD in ecuadorian population.

KEY WORDS: Alzheimer's disease, polymorphisms, Apolipoprotein E, genotyping, alleles, risk factor.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las enfermedades neurodegenerativas, descritas como la $\pi\mu\rho\delta\iota\delta\alpha$ progresiva e irreversible de las estructuras neuronales del cerebro, siguen constituyendo un problema de salud pública de gran relevancia y un desafío para los servicios de neurología, neurorradiología y medicina nuclear a nivel mundial. Muchas de estas patologías son de origen genético, lo que confiere un patrón hereditario o el desarrollo de una mutación genética. Algunos cuadros clínicos como el alcoholismo, derrames, tumores, traumas, toxinas y exposición a sustancias químicas se pueden atribuir a su desarrollo, y a pesar de que la mayoría no tiene cura, la identificación de procesos patológicos asociados con la vulnerabilidad neuronal de estas enfermedades y avances en el diagnóstico temprano podrían facilitar el desarrollo de terapias mucho más efectivas, así como condiciones para prevenir su inicio, demorando su agresividad, aliviando los síntomas y prolongando el tiempo de vida del paciente. (Voet, 2010).

Con el desarrollo de la medicina y el aumento de la esperanza de vida de la población, las enfermedades de tipo neurodegenerativas (Alzheimer, Esclerosis múltiple, Huntington, Parkinson, etc.) han incrementado su incidencia desplazando a las causas de mortalidad más frecuentes, y no solamente eso, sino que además su padecimiento conlleva un período largo de tiempo (entre 10-20 años) confiriendo un interés científico y económico, por cuanto es muy costoso mantener tanto a los pacientes enfermos como al personal encargado de su cuidado, motivo por el cual se hace indispensable la realización de investigaciones que brinden un apoyo aún más sustancial para los problemas que conllevan estos desalentadores trastornos.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la neuropatía más frecuente y principal causa de demencia en los adultos mayores (personas de más de 60 años de edad), y debido a que el número de individuos que sufren de este trastorno asciende día a día, es de vital importancia para los neurólogos clasificar de manera adecuada a los pacientes con el fin de introducirlos en terapias, tratamientos y ensayos clínicos para estabilizar su sintomatología o bien al menos mejorar su calidad de vida. Para ello se han implantado diversos estudios con el objetivo de conocer la etiología de la EA aún indefinida y al no existir una prueba que establezca un diagnóstico veraz y definitivo de la enfermedad, otros países están incluyendo la realización de exámenes de tipo genético molecular para ayudar a esclarecer con mayor certeza y de manera precoz el padecimiento de esta fulminante patología. (Villacis, 2011; Voet, 2010).

Actualmente alrededor de 25 millones de personas padecen la enfermedad de Alzheimer a nivel mundial y de acuerdo a su incidencia se calcula que en tres décadas habrá el doble de personas afectadas, convirtiéndose en un problema de gran escala para millones de familias, entidades e instituciones de salud de todo el mundo. En el Ecuador este trastorno es la cuarta causa de muerte representando un 6.25 % del total de las causas de mortalidad en el país, encontrándose solamente por detrás de la Diabetes mellitus, enfermedades hipertensivas y enfermedades de tipo cerebrovascular. En nuestro país son muy pocas las investigaciones acerca de esta patología pese al impacto que desencadena en el paciente, su familia y el entorno en el que se desenvuelve. (Bick 1994), (Kircher 1996), (Eisendrath, 2006; Villacis, 2011; Voet, 2010).

En el Ecuador existen aproximadamente 1'229.069 adultos mayores de los cuales el 69 % ha requerido atención médica los últimos ocho meses y mayoritariamente son atendidos en Hospitales, instituciones de salud y consultorios particulares. El 53.4 % de la población ecuatoriana de adultos mayores la constituyen mujeres y su rango de edad está comprendido entre 60 y 65 años. El 42 % de los adultos mayores no trabaja debido a problemas de salud típicos de la edad, además la gran mayoría de estas personas únicamente tiene un nivel de educación primario, lo que les convierte en individuos totalmente dependientes de sus familiares por su incapacidad de generar un ingreso económico propio para sustentarse. (Villacis, 2011).

Los exámenes utilizados con mayor frecuencia para establecer un diagnóstico presuntivo de la EA incluyen la realización de una anamnesis completa, en la que se evalúan primordialmente parámetros como el deterioro de la memoria, de las funciones del

lenguaje, del aprendizaje y la retención de información, pérdida de la orientación geográfica y de la habilidad visuoespacial, entre otros. Además se revisan minuciosamente la historia clínica y los exámenes de imagen como tomografías y resonancias magnéticas. Sin embargo, los exámenes antes mencionados no garantizan que el paciente padezca la enfermedad pues la única manera de confirmar esta patología es por medio de exámenes anatómicos patológicos del cerebro tras la muerte del paciente (autopsia). Por la sintomatología puede ser confundida con otras enfermedades de tipo neurodegenerativo o algunas de las manifestaciones en la etapa de envejecimiento normal del ser humano pueden tomarse erróneamente como presentación de EA, cabría también la posibilidad de que los exámenes no fueron realizados correctamente; todo esto conlleva a una pérdida de tiempo y dinero tanto para el paciente como para sus familiares en el caso de que el individuo no padezca la enfermedad.

En otros países se han implementado técnicas de tipo genético molecular basadas en el análisis de factores de susceptibilidad involucrados en el desarrollo de la EA, como el PCR-RFLP, PCR en tiempo real (RT-PCR), y la secuenciación, estableciendo una probabilidad mucho más alta y confiable de diagnosticar al paciente como enfermo de Alzheimer por su alta sensibilidad y especificidad frente a otros procedimientos de tipo clínico y de imagen. (Voet, 2010).

Hasta la fecha existen muy pocos laboratorios que han implementado estas técnicas genético-moleculares para el análisis de este tipo de enfermedades en el Ecuador, debido al alto costo de los equipos y reactivos utilizados en este tipo de procedimientos, lo que impide cubrir las necesidades de los servicios de investigación y que conlleva a que las muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de padecer la EA sean remitidas a laboratorios de referencia en otros países (Colombia, España, Argentina) para su análisis respectivo.

La enfermedad de Alzheimer se ajusta a un modelo de enfermedad multifactorial, causada por la interacción de los productos de varios genes y factores ambientales; sin embargo, ninguno de estos factores es necesario ni suficiente para causar la enfermedad, lo que implica la existencia de genes y factores ambientales aún desconocidos. Se sabe que 4 cromosomas son los implicados en el desarrollo de la EA: 1, 14, 19 y 21. Los cromosomas 1, 14, y 21 describen mutaciones responsables de las demencias autosómicas dominantes y de inicio temprano, representando aproximadamente un 5-10 % (muy raras) de todos los casos, mientras que la variante

tardía representa alrededor del 90 % de los casos de EA, y aunque este tipo de variante tardía no tiene un gen específico que produzca la enfermedad, existen factores de riesgo que incrementan en gran forma la probabilidad de desarrollarla, siendo el gen de la Apolipoproteína E codificado por el cromosoma 19, el mayor factor de susceptibilidad para esta patología. (Nih, 2011; Philip, 2011; Voet, 2010).

La Apolipoproteína E es una proteína encargada del transporte de lipoproteínas, vitaminas y colesterol hacia el sistema linfático y posteriormente a la sangre. Es sintetizada en el hígado, cerebro, riñón y bazo. En el sistema nervioso, los astrocitos y la microglía son los principales productores de Apo-E. Esta proteína, sintetizada por un gen que lleva su mismo nombre, consta de cuatro exones y tres intrones, confiriendo tres tipos de alelos debido a su origen pleomórfico: Apo-E2, Apo-E3 y Apo-E4, que a su vez traducen tres isoformas distintas de la proteína: Apo-E ϵ 2, Apo-E ϵ 3, y Apo-E ϵ 4, siendo este último el factor de alta susceptibilidad para el desarrollo de la EA. (Eisendrath, 2006; Kircher, 1996; Voet, 2010).

Si bien actualmente las técnicas genético-moleculares son las herramientas de mayor relevancia para el diagnóstico confirmatorio para el análisis de enfermedades como la EA debido a su alta sensibilidad, especificidad y por requerirse pequeñas cantidades de material biológico de partida, se debe reconocer su nivel de exigencia en cuanto a la capacitación del personal y que además en nuestro medio una de las principales limitaciones es su costo relativamente elevado.

El Ministerio de Salud del Ecuador dentro de su programa "RED DE PROTECCIÓN SOLIDARIA" apoya a pacientes con enfermedades catastróficas como las leucemias, insuficiencia renal, VIH (SIDA) y cáncer en general, pero aún no han establecido programas de apoyo a pacientes con EA y a sus familiares tanto con soporte médico, económico y psicológico.

Por otro lado los médicos solicitan exámenes de imagen como tomografías, resonancias magnéticas y otros exámenes de laboratorio clínico para establecer un diagnóstico probable, el tratamiento y el control de estos pacientes; algunos de estos procedimientos además de ser incómodos, molestos, costosos y difíciles de realizar por el estado mental del paciente, producen efectos secundarios, lo que impide un seguimiento adecuado del mismo, agravando su situación y empeorando aún más su calidad de vida. (González, 2007; Voet, 2007).

El problema de la enfermedad de Alzheimer radica en la carencia de un diagnóstico certero, que pueda detectar la patología en etapas iniciales, convirtiéndose de esta manera en un problema de salud pública. El objetivo de la detección a nivel molecular de esta patología en pacientes con síntomas de demencia es evitar el uso frecuente de técnicas de alto costo, innecesarias e incómodas como los exámenes de imagen, que son los que se realizan en nuestro medio como únicos métodos de diagnóstico, empleando métodos moleculares que se caracterizan por su alta sensibilidad, especificidad y por requerirse pequeñas cantidades de material biológico de partida, lo que ha permitido que países desarrollados la utilicen como gran factor de susceptibilidad para dicha enfermedad obteniendo resultados mucho más veraces en poblaciones de alto riesgo. (Burns, 2002; González, 2007; Graeber, 1999; Voet, 2007).

Debido a los avances en la ciencia y la medicina, la esperanza de vida de la población a nivel mundial ha aumentado mucho más que en el pasado, esto implica que la incidencia en el número de personas afectadas con EA crezca conforme se incrementa la edad del paciente: su presentación es muy poco frecuente antes de los 50 años, entre el 1 y el 2 % en individuos de 51 a 60 años, 3-5 % en adultos de 61 a 70 años, 15-20 % en sujetos de 71 a 80 años y alrededor del 50 % en adultos de 81 años o más. (Burns, 2002; Graeber, 1999; Voet, 2007).

Conforme el tiempo transcurre, el estilo de vida, el estrés, la mala alimentación y los factores genético-ambientales promueven en gran parte que varias de las patologías, especialmente las de tipo degenerativas como la enfermedad de Alzheimer, sigan desarrollándose con un desenlace crónico cada vez mayor y originando un pronóstico aún más desalentador.

Esta enfermedad, muy poco estudiada en nuestro país, se caracteriza por la presencia de placas seniles y la formación de ovillos neurofibrilares, ocasionando un desarrollo insidioso, progresivo e irreversible de la enfermedad, que con un pronóstico no alentador, y una cura aún desconocida, hacen de esta patología un trastorno definitivo para el paciente y una carga permanente para las familias de los afectados. (Bick, 1994; Ketti 2007; Kircher, 1996; Voet, 2007).

La Escuela de Bioanálisis junto con la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENESCYT) desarrolla actualmente un proyecto denominado *“GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, ATENDIDOS EN INSTITUCIONES GERIÁTRICAS DE LA CIUDAD DE QUITO”*, que fue presentado por el docente de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, Rolando Avilés, PhD, a la Dirección de Investigación y Postgrados de la Dirección General Académica de la PUCE, institución que aprobó y financió dicho proyecto. El proyecto se desarrolló en diferentes etapas y la presente disertación corresponde a una parte de la misma, cuya fase experimental se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Bioanálisis-PUCE.

La limitante que afronta el estudio es el trabajar con pacientes que presentan un diagnóstico presuntivo de la EA y no un definitivo debido a la dificultad en el diagnóstico mismo y porque sus factores de riesgo y etiológicos aún no están bien establecidos.

De acuerdo a lo indicado anteriormente, se plantearon las siguientes interrogantes:

¿Cuántos de los pacientes con diagnóstico presuntivo de padecer la enfermedad de Alzheimer a nivel clínico presentan asociación genética con el alelo $\epsilon 4$ en el polimorfismo del gen de la Apolipoproteína E?

¿Es el alelo $\epsilon 4$ del gen de la Apolipoproteína E un factor de susceptibilidad importante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en su variante tardía?

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Genotipificar el gen de la Apolipoproteína E a través de la detección de polimorfismos mediante la técnica molecular de PCR convencional y corte con enzimas de restricción, en pacientes con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer, en su variante tardía, atendidos en Hospitales e Instituciones de Salud de la ciudad de Quito, en el período comprendido entre mayo a diciembre del 2012.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtener datos clínicos de los pacientes con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer a partir del historial médico que llevan los Hospitales e Instituciones de Salud de la ciudad de Quito, en el período comprendido entre mayo a diciembre del 2012.
- ✓ Estandarizar la técnica molecular mediante PCR convencional (amplificación) y corte con enzimas de restricción (digestión) para la detección de polimorfismos en el gen de la Apolipoproteína E en las muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de la EA, en su variante tardía, atendidos en Hospitales e Instituciones de Salud de la ciudad de Quito, en el período comprendido entre mayo a diciembre del 2012.
- ✓ Establecer por PCR convencional y corte con enzimas de restricción la frecuencia de polimorfismos en el gen de Apolipoproteína-E en pacientes con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer, en su variante tardía, atendidos en Hospitales e Instituciones de Salud de la ciudad de Quito, en el período comprendido entre mayo a diciembre del 2012.
- ✓ Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *APO-E* en pacientes con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer en su variante tardía, atendidos en Hospitales e Instituciones de Salud de la ciudad de Quito, en el período comprendido entre mayo a diciembre del 2012.

CAPÍTULO II

LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1 ANTECEDENTES

La enfermedad de Alzheimer hace referencia a un trastorno caracterizado por el deterioro progresivo de las funciones cognitivas y mentales, alterando la memoria y la consciencia durante su padecimiento, afectando la calidad de vida del enfermo y de quienes lo rodean. Esta patología representa la primera causa de demencia a nivel mundial y a pesar de que su etiología no es comprendida en su totalidad aún, sus factores genéticos están mejor detallados, reconocidos a principios del siglo XX por el neuropsiquiatra alemán Alois Alzheimer. (Myers, 1996; Roses, 1996; Silva García, 2009; Voet, 2007).

En 1907, Alzheimer describió por primera vez a la enfermedad después de su estudio con la paciente Auguste Deter, de 51 años de edad, a quien atendía desde 1901. Auguste presentaba sintomatología como pérdida severa de memoria, déficit de las funciones mentales, desorientación, alteraciones del lenguaje y conducta. La paciente murió cuatro años después en un estado de severa demencia y fue ella quien lo llevaría a descubrir la patología. En el análisis post mortem de la paciente, se encontraron alteraciones cerebrales, atrofia cerebral, presencia de cuerpos llamados placas seniles y ovillos neurofibrilares. (Myers, 1996; Navarro, 2010; Roses, 1996; Silva García, 2009)

Durante la última década del siglo XX, estudios acerca del deterioro de las funciones cognitivas y la evolución de este trastorno han descrito varios factores genéticos que

producen Alzheimer, como mutaciones en los cromosomas 21, 14, y 1 que corresponden a los genes β -Amiloide, presenilina 1 y presenilina 2 respectivamente en la forma temprana de la enfermedad, y del gen de la Apolipoproteína E situado en el cromosoma 19, que corresponde a la forma tardía de la patología. (Myers, 1996; Roses, 1996; Silva García, 2009; Voet, 2007).

Roses y sus colaboradores (1996), describieron por primera vez la relación que tiene el alelo ϵ 4 de la Apolipoproteína E con la enfermedad, así en los pacientes de etnia caucásica que padecen este trastorno encontraron una asociación del 50% para dicho alelo. (Myers, 1996; Roses, 1996; Silva García, 2009; Voet, 2007).

A la fecha de la realización de este estudio, no se encontraron datos publicados de la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en Ecuador y muy pocos hacen referencia a la frecuencia de polimorfismos del gen de la Apolipoproteína E en la población ecuatoriana. Sin embargo, en una revisión de 25 estudios realizados entre 1966 y 1999 en Latinoamérica, sugiere que se ha producido un aumento en las tasas de prevalencia en los últimos años. A este incremento contribuyen varios factores, en primer lugar, el progresivo envejecimiento de la población, que supone un mayor porcentaje de personas en edad de riesgo y, en segundo lugar, la mejora de las condiciones socioeconómicas, los avances en el tratamiento médico y la mayor supervivencia después del inicio de la enfermedad.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo, progresivo e irreversible de la corteza cerebral, caracterizado por el deterioro del pensamiento, deficiencia en el lenguaje, alteraciones de la conducta, problemas de atención, destrucción neuronal y la pérdida definitiva de la memoria. La discapacidad y la dependencia que provoca este proceso suponen un obstáculo infranqueable en la consecución del denominado envejecimiento satisfactorio de un individuo (Nih, 2011; Philip, 2011; Voet, 2007).

Existen varios subtipos de la enfermedad, sin embargo varios autores las simplifican en dos tipos: Alzheimer de comienzo precoz y de comienzo tardío. La variante de comienzo

precoz representa aproximadamente el 5 % de los pacientes con dicha patología, quienes tienen una edad comprendida entre 25 y 55 años de edad y es producida por mutaciones de genes específicos (presenilina 1, presenilina 2, y β -Amiloide) en su mayoría adquiridos de forma hereditaria, mientras que la variante de comienzo tardío se desarrolla a partir de los 55 años de edad, representando alrededor del 90 % de los casos y es producida por factores ambientales, genéticos y el estilo de vida. (Nih, 2011; Philip, 2011; Voet, 2007).

Según estudios sobre esta enfermedad, este tipo de variante tardía no tiene un gen específico que produzca la enfermedad, sin embargo, existen factores de riesgo que incrementan en gran forma la probabilidad de desarrollarla, siendo el gen de la Apolipoproteína E el mayor factor de susceptibilidad para esta enfermedad. (Nih, 2011; Philip, 2011; Voet, 2007).

2.2.2 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA EA

En la enfermedad de Alzheimer el aspecto clínico de mayor relevancia es sin duda la pérdida de la memoria y conforme avance el trastorno también incrementarán deterioros cognitivos como la disfunción ejecutiva, los trastornos del lenguaje y actividades de la vida diaria, la apraxia y otros trastornos neuropsiquiátricos incluyendo el comportamiento del individuo. (Farma, 2012; Voet, 2007).

2.2.3 DESÓRDENES CONGNITIVOS DE LA EA

Este tipo de trastornos generalmente están presentes desde el inicio, donde el individuo pierde la capacidad de mantener información, captación, atención, orientación y aprendizaje, alteraciones que se van agravando progresivamente conforme avanza la enfermedad. (Farma, 2012; Voet, 2007).

2.2.4 DESÓRDENES EMOCIONALES DE LA EA

Este tipo de desórdenes son circunstancialmente los que afectan en gran manera a los pacientes, sus familiares y a los especialistas, abarcando conductas de depresión, irritabilidad, delirios, incoherencias, alucinaciones, enfados, ansiedad, nerviosismo, labilidad emocional, violencia, agresión, indiferencia y en casos extremos suicidios. . (Farma, 2012; Voet, 2007).

2.2.5 FISIOPATOLOGÍA DE LA EA

La enfermedad de Alzheimer está caracterizada por un trastorno cognitivo progresivo (que comienza entre los 50-90 años) inicialmente leve, con problemas de la memoria y que conduce al deterioro cerebral y físico de la persona ocasionando incapacidad mental. A nivel fisiopatológico, el daño estructural y funcional en la EA aparece por la acumulación excesiva de placas seniles y ovillos neurofibrilares que se dispersan por todo el cerebro, pero que afectan particularmente a las neuronas del sistema colinérgico del cerebro anterior, a las del hipocampo y a las de la amígdala. Tal daño acumulado por años, va deteriorando la capacidad amnésica y ello determina los cuadros cognitivos iniciales y la demencia e incapacidad física final, que culmina en la muerte del individuo. (Corrada, 2010; Fratiglioni, 2005; Kawas, 2005; Voet, 2007).

2.2.6 PLACAS SENILES Y OVILLOS NEUROFIBRILARES

Las placas seniles son depósitos de una proteína insoluble llamada beta amiloide (βA) que actúa como centro de degeneración neuronal, puesto que engloba y distorsiona progresivamente a los elementos nobles, somas y prolongaciones neuronales (axones y dendritas) o neuritas. Estas placas se encuentran en las estructuras intracerebrales involucradas en la memoria y el control emocional, la amígdala, el hipocampo y los núcleos basales colinérgicos del cerebro anterior. (Voet, 2007).

Los ovillos neurofibrilares están conformados por una proteína del citoesqueleto modificada (la proteína Tau) y distorsionan la arquitectura de los neurotúbulos y microfilamentos a tal punto de impedir el flujo axonal. Tanto las placas como los ovillos no son exclusivos de la EA, pues es común que un cerebro senil también contenga placas y ovillos aunque en cantidad inferior. Por lo tanto la distinción entre EA y envejecimiento normal es una cuestión cuantitativa más que cualitativa y de aparición a edad más temprana. Además de las placas y los ovillos se observan amiloide perivascular y depósitos de lipofuscina. (Corrada, 2010; Voet, 2007).

Según estudios, la enfermedad de Alzheimer converge en tres teorías a nivel patológico:

- 1) *La teoría inflamatoria*, que indica que el núcleo de la célula cerebral afectada atrae microglia y que se autoperpetúa por más depósito, liberación de mediadores y radicales libres del oxígeno. Estos a su vez dañan las neuronas vecinas y éstas

responden generando neuritas anómalas. Finalmente, la muerte neuronal agranda la placa hacia afuera y cierra el círculo atrayendo más microglia y astrocitos reactivos.

2) *La teoría neurotóxica*, que indica que la acumulación de beta amiloide (βA) favorece la entrada de calcio de manera desmedida y ello desencadena la toxicidad neuronal característica. Este mecanismo actúa sinérgicamente con el anterior para producir necrosis.

3) *La teoría apoptótica*, que indica que el resto de βAPP (proteína precursora de beta amiloide) que queda en la membrana reduce constitutivamente los niveles de AMPc y ello desencadena la apoptosis (mecanismos de daño del citoesqueleto). Los ovillos neurofibrilares se forman por una variante de la proteína Tau del citoesqueleto. Esta variante altamente fosforilada altera por precipitación intracelular a nivel axónico o dendrítico toda la estructura y función del terminal nervioso, culminando en inflamación, isquemia y apoptosis. (Corrada, 2010; Fratiglioni, 2005; Kawas, 2005; Silva García, 2009; Voet, 2007).

En el mecanismo de inflamación se producen cambios bioquímicos en las neuronas, iniciando con una disfunción en la permeabilidad de la membrana, ocasionando la rotura y muerte posterior de la célula nerviosa. En el individuo con EA la inflamación es un catalizador de la muerte neuronal, este proceso rodea las placas neuríticas y sustancias mediadoras como las interleucinas, activando el sistema del complemento y ocasionando la muerte de las células nerviosas. Existe una alteración en la supervivencia celular debido a elementos neurotóxicos como los radicales libres, el calcio, y otros, al interferir con el correcto desempeño de la membrana neuronal y de la mitocondria. (Silva García, 2009; Voet, 2007).

La apoptosis aumenta significativamente en los individuos con EA según su expresión genética y aunque todavía se desconocen los factores externos y la predisposición individual, se revela una pérdida masiva de neuronas en los pacientes con esta patología. (Silva García, 2009; Voet, 2007).

2.2.7 FACTORES DE RIESGO EN LA EA

La edad es el principal factor de riesgo para la presentación de la EA. Estudios recientes destacan que la edad promedio en la que aparecen signos y síntomas de demencia totalmente evidentes es entre 60 y 85 años, y que además la incidencia es aún mayor en el sexo femenino debido a la distribución de factores genéticos y ambientales. Las razones por las cuales el sexo femenino puede presentar un mayor riesgo para desarrollar EA pueden ser: una supervivencia selectiva de los hombres en edades avanzadas, niveles bajos de estrógenos en las mujeres frente a los hombres debido a la metabolización de la testosterona o que simplemente el sexo femenino presenta una mayor susceptibilidad genética a padecer este trastorno. (Corrada, 2010; James, 2010; Voet, 2007).

Un nivel de educación bajo también se considera un factor de riesgo para la EA. Diversas investigaciones a nivel mundial sostienen la idea de que la baja escolaridad aumenta el riesgo de padecer EA, sin embargo, aún existe controversia para definir esta asociación. El efecto de la educación puede ser cuantitativo, es decir, que existiese una relación lineal entre el número de años de educación y el riesgo de EA, o podría ser cualitativo, es decir, que exista un efecto de umbral para cierto nivel educativo y en este caso tendría mayor importancia la capacidad intelectual del sujeto que los años de educación recibidos. Aun así, en la actualidad se mantiene la idea de que la educación podría promover un crecimiento dendrítico en la corteza cerebral y así, individuos con elevada educación podrían estar protegidos de alguna forma contra el desarrollo de la EA. (Corrada, 2010; Fratiglioni, 2005; Kawas, 2005; Voet, 2007).

2.2.8 GENÉTICA DE LA EA

Aunque la enfermedad de Alzheimer es generalmente un trastorno esporádico, en cuya aparición interviene una susceptibilidad genética, existen casos de EA de inicio temprano relacionados con mutaciones en una serie de genes, cuya frecuencia apenas alcanza el 1-5% del total de casos de EA. A nivel genético molecular se han identificado 4 genes específicos, 3 de ellos se describen para su forma de inicio temprano y de característica autosómica dominante. Estos genes comprenden la presenilina 1 (*PES 1*), presenilina 2 (*PES 2*) y el de la proteína precursora amiloide (*APP*). El cuarto gen comprende el factor de riesgo genético más relevante para la enfermedad en su fase tardía, el de la

Apolipoproteína E (*APO-E*), cuyo alelo $\epsilon 4$ es el que se manifiesta en el trastorno. (Farma, 2012; Nih, 2011; Philip, 2011; Voet, 2007).

2.2.9 APOLIPOPROTEÍNA-E

La Apolipoproteína E es una glicoproteína de 34.2 kDa y 229 aminoácidos, expresada en el hígado, cerebro, glándulas suprarrenales, ovarios y placenta. Esta glicoproteína constituye parte de los quilomicrones, lipoproteínas VLDL y HDL, participando en transporte y metabolismo de lípidos al actuar como ligando de las lipoproteínas LDL y de los receptores de APO-E, además interviene en la inmunoregulación, la regeneración de los nervios y en la activación de enzimas lipolíticas como la lipasa hepática, lipasa lipoproteica y la lecitina-colesterol aciltransferasa. (Beyer, 2002; Marca, 2011; Paz y Miño, 2010; Voet 2007).

El gen *APO-E* está localizado en el cromosoma 19 (locus 19q13.2). Este gen contiene 4 exones y manifiesta un polimorfismo común en el exón 4. Dicho polimorfismo presenta tres alelos o isoformas diferentes: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, y cuya combinación genera seis genotipos. (Marca, 2011; Nih, 2011; Philip, 2011; Voet, 2007).

El riesgo atribuido por ser portador de uno o dos alelos $\epsilon 4$ es máximo entre los 60 y 85 años para descender por encima de esa edad, actuando entonces otros factores genéticos o ambientales aún no identificados. En relación al sexo o los diferentes grupos étnicos, los datos sugieren que el efecto de APO-E es mayor en mujeres y en individuos de raza caucásica. (Navarro, 2010; Oddo, 2003; Pastor, 2004).

El alelo APO $\epsilon 2$ (0-20 %) es relativamente raro y según estudios recientes confiere protección contra la enfermedad, disminuyendo el riesgo de incrementar los niveles de colesterol y de beta lipoproteínas, así como el aumento de depósitos de amiloide en el cerebro. El alelo APO $\epsilon 3$ (60-90 %) es el más frecuente y confiere un rol neutral en la enfermedad, es decir, no reduce ni incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad. El alelo APO $\epsilon 4$ está presente en alrededor del 25-30 % de la población y alrededor del 40 % de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. (Marca, 2011; Nih, 2011; Philip, 2011).

Según los estudios de Nih (2011), Philip (2011) y Marca (2011), la presencia de por lo menos un alelo $\epsilon 4$ es considerado como un factor de riesgo para desarrollar Alzheimer,

debido a que su presencia favorece la elevación de los niveles de colesterol y beta lipoproteínas, un mayor depósito de amiloide en las placas seniles ocasionando la degeneración neurofibrilar y pérdida neuronal; aunque se han reportado casos en los que los pacientes poseen uno o dos alelos $\epsilon 4$ y nunca desarrollaron la enfermedad, y otros quienes no poseen ningún alelo $\epsilon 4$ la han desarrollado.

La base del polimorfismo de APO-E consiste en intercambios de cisteína y arginina. El alelo $\epsilon 3$ contiene una cisteína en el residuo 112 y una arginina en el codón 158. El alelo $\epsilon 2$ contiene cisteínas en ambos codones y el alelo $\epsilon 4$ está conformado por dos argininas en los codones 112 y 158. (Beyer, 2002; Navarro, 2010; Oddo, 2003; Pastor, 2004).

2.2.10 *DIAGNÓSTICO DE LA EA*

En la enfermedad de Alzheimer, la única manera de confirmar que un individuo padece la patología es mediante un examen anatómico patológico del cerebro tras la muerte del paciente, el mismo que permite observar todas las lesiones características de la enfermedad (placas seniles y ovillos neurofibrilares, propios de la enfermedad; la cantidad de los últimos es proporcional al estado de la enfermedad del individuo); como este procedimiento no es posible realizarlo en los pacientes en la etapa de diagnóstico, este se basa en algunos criterios que de encontrarse en el paciente se considera con una alta probabilidad que puede tener la enfermedad. A continuación se detallan estos criterios diagnósticos:

- a) La historia clínica, para observar los antecedentes médicos del individuo y de su familia.
- b) El examen neuropsicológico, para asegurar que la sintomatología del paciente corresponde a un tipo de demencia.
- c) Estudios de neuroimagen: tomografías computarizadas y resonancias magnéticas, para la observación de las lesiones estructurales características de la enfermedad.
- d) Marcadores biológicos basándose en mutaciones, alteraciones o sobreexpresión genética, para evaluar la enfermedad a partir de sustancias sintetizadas por el propio organismo: sangre o tejidos, especialmente ADN, con el fin de analizar genes asociados con la patología. (Adra, 2010; Navarro, 2010; Oddo, 2003; Pastor, 2004; Voet, 2007).

2.3 MARCO CONCEPTUAL

Alelo: Un alelo es cada una de las formas alternativas que puede tener un gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Apolipoproteína E (APO-E): Glicoproteína involucrada en el transporte de colesterol y otros lípidos a través de las membranas celulares en el cerebro. Está involucrada en el crecimiento celular y la regeneración neuronal.

Apraxia: Alteración de la gestualidad (acto motor con finalidad) que no se explica por trastornos motores elementales (disonia, temblor, etc.) y con pleno conocimiento del acto que se realiza.

Codón: Triplete de tres bases, en una molécula de ADN o ARN que codifica un aminoácido específico.

Consentimiento informado: Es el procedimiento médico formal cuyo objetivo es aplicar el principio de autonomía del paciente. Debe reunir al menos tres requisitos que son: libertad de decisión para el paciente participante, debe ser comprensible en su totalidad acerca de todos los procedimientos a realizar, y debe brindar toda la información pertinente (beneficios, riesgos potenciales y la posibilidad de rechazar el tratamiento o estudio una vez iniciado en cualquier momento, sin inconveniente alguno).

Demencia: Es un síndrome clínico caracterizado por un déficit adquirido en más de un dominio cognitivo, que representa una pérdida respecto al nivel previo y que reduce de forma significativa la autonomía funcional. La demencia cursa frecuentemente con síntomas conductuales y psicológicos, también denominados síntomas conductuales y emocionales o síntomas neuropsiquiátricos.

Factor de riesgo: Es toda circunstancia que aumenta las probabilidades de un individuo de contraer una enfermedad.

Fenotipo: Totalidad de la naturaleza física, bioquímica y fisiológica de un individuo, tal como viene determinada por su genotipo y el ambiente dentro del cual se desarrolla.

Función cognitiva: Es la habilidad de percibir, pensar y aprender, funciones fundamentales del cerebro intacto. Una función cognitiva pobre imposibilita la capacidad de una persona para llevar a cabo las acciones simples de la vida.

Gen: Parte de una molécula de ADN que codifica la síntesis de un determinado polipéptido.

Genotipo: Es la constitución genética funcional de una célula o de un organismo. Es decir, son todos los genes o alelos que codifican la forma.

Ovillos neurofibrilares: La presencia de ovillos neurofibrilares son propios de la EA y están formados por estructuras anómalas de la neurona denominadas filamentos pareados helicoidales (PHFs). Los PHFs producen serias alteraciones neuronales conllevando a la incapacidad funcional celular y de transmitir mensajes nerviosos desembocando en el proceso neurodegenerativo.

Placas seniles: Las placas seniles son depósitos de péptido amiloide a nivel extracelular, producto del metabolismo de la proteína precursora amiloide (PPA), la misma que está conformada aproximadamente por 39 a 43 aminoácidos. El precursor está situado en la membrana plasmática, presentando diferentes isoformas, y aunque aún se desconoce la función de la PPA en la célula, su expresión incrementa en alteraciones como el estrés celular; sin embargo, las razones que inducen este aumento con el desarrollo de la enfermedad son aún desconocidas.

Polimorfismo genético: Es una variación en la secuencia de un lugar determinado de ADN entre los individuos de una población; es la existencia de múltiples alelos de un mismo gen presentes en una población, normalmente expresados como diferentes fenotipos, que aparecen con una frecuencia significativa de al menos en un 1% de la población.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Esta investigación tiene un diseño descriptivo, transversal en el que se realizó la estandarización de la técnica de PCR convencional y digestión enzimática para la detección de polimorfismos en el gen *APO-E* y la determinación de la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de dicho gen en pacientes con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer en su variante tardía.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población en estudio la constituyeron los adultos mayores, de 55 a 90 años de edad con diagnóstico presuntivo de la EA, que residen en la ciudad de Quito y que son atendidos en los Hospitales y las Instituciones geriátricas de dicha ciudad, las que se indican a continuación:

Hospitales:

- ✓ Hospital Psiquiátrico Julio Endara.
- ✓ Hospital Pablo Arturo Suárez.
- ✓ Hospital Carlos Andrade Marín.
- ✓ Hospital General de las Fuerzas Armadas.

Hogares de Ancianos:

- ✓ Sagrado Corazón de María.
- ✓ La Estancia de Otoño.
- ✓ Los Olivos.
- ✓ Nuevo Amanecer.

El análisis de laboratorio se realizó a partir del ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído a partir de sangre periférica obtenida por punción venosa.

3.3 TAMAÑO MUESTRAL Y MUESTREO

Para el tamaño muestral se tomó en cuenta el grado de aceptación o rechazo de las instituciones de salud, de los pacientes y/o sus representantes, el presupuesto limitado para la realización del estudio, el costo de las técnicas empleadas y los criterios de selección intencionada por parte del investigador (signos y síntomas de cada paciente, historia clínica, edad, y antecedentes sobre la EA).

El muestreo fue de tipo no probabilístico por conveniencia para una n de 100 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos.

3.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

3.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se tomaron en cuenta a todos los pacientes:

- ✓ Con diagnóstico clínico presuntivo de padecer la enfermedad de Alzheimer.
- ✓ De nacionalidad ecuatoriana.
- ✓ Con edades comprendidas entre 55 y 90 años de edad, tanto varones como mujeres.
- ✓ Que residían y eran atendidos en Instituciones de Salud y geriátricas exclusivamente en la ciudad de Quito, al momento que se realizó el estudio.
- ✓ Que firmaron el consentimiento informado, aceptando participar en la investigación.

3.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

No fueron tomados en cuenta los pacientes:

- ✓ Con otras nacionalidades.
- ✓ Con diagnóstico presuntivo de otro tipo de enfermedad neurodegenerativa.

3.5 RECOPIACIÓN DE DATOS

Para la recopilación de información se utilizó un formato de trabajo (Anexo 1) para registrar datos personales, historias clínicas y antecedentes de los pacientes con diagnóstico presuntivo de la enfermedad, a partir de las bases de datos de las Instituciones de Salud, previa autorización por parte de las autoridades de las mismas y la aprobación del consentimiento informado por parte del paciente y/o sus familiares. La investigación fue desarrollada durante el período comprendido entre mayo a diciembre del 2012.

CONSENTIMIENTO INFORMADO: El consentimiento informado se emitió a cada uno de los pacientes previo a la toma de muestras sanguíneas y al conocimiento del esquema de trabajo del proyecto de investigación, en el cual están detallados todos los procedimientos que se llevarán a cabo antes, durante y después de la toma de muestra. (Anexo 2).

Se concedió absoluta libertad tanto al paciente como a sus familiares para preguntar sobre cualquier aspecto que les permita aclarar todas sus inquietudes. Luego de la aceptación a participar en el estudio se procedió con la toma de muestra sanguínea y el registro de los datos del paciente, caso contrario el paciente no fue incluido en esta investigación.

3.6 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Una vez aprobadas tanto las autorizaciones de las Instituciones de Salud como el consentimiento informado por parte del paciente y/o sus familiares, se aplicaron varios protocolos para la extracción, la conservación, el procesamiento de las muestras y el análisis final de los resultados obtenidos de acuerdo a la etapa de desarrollo de la parte experimental.

3.6.1 TOMA Y MANEJO DE MUESTRA SANGUÍNEAS

Para la toma y conservación de las muestras sanguíneas se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- ✓ Condiciones preanalíticas del paciente: no es necesario ayuno, ni dieta especial y no afecta a la prueba si el paciente toma o no medicación al momento del examen.
- ✓ Extracción sanguínea: toma por venopunción con sistema de tubos al vacío, 3 ml de sangre en tubos con EDTA 5% (como anticoagulante).
- ✓ Condiciones de transporte y almacenamiento de las muestras sanguíneas: mantener las muestras biológicas en refrigeración, de 4 a 8°C durante el traslado y posterior almacenamiento, para evitar cambios de temperatura en la muestra que promueven la degradación del ADN.

3.7 METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

El trabajo se realizó en cinco etapas, las que se describen a continuación de forma general:

1. Etapa 1: acercamiento e información del estudio al personal médico de las Instituciones de salud y a los pacientes con diagnóstico presuntivo de EA variante tardía y/o familiares; obtención de la autorización por directivos y consentimiento informado así como recopilación de datos sociodemográficos y clínicos de los pacientes.
2. Etapa 2: recolección de las muestras de sangre periférica de los pacientes con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer en su variante tardía, atendidos en Instituciones de Salud de la ciudad de Quito en el período comprendido entre mayo a diciembre del 2012.
3. Etapa 3: procesamiento de las muestras, en la que inicialmente se realizó la extracción de ADN mediante el kit de extracción "DNA PURELINK GENOMIC" de la casa comercial INVITROGEN. Una vez realizada la extracción se procedió a cuantificar el ADN empleando el fluorómetro QUBIT 2.0 de la misma casa comercial.

4. Etapa 4: estandarización de la técnica molecular PCR convencional, para la amplificación del gen *APO-E* y posteriormente el corte con enzimas de restricción para la detección de polimorfismos en dicho gen.
5. Etapa 5: organización y análisis de los resultados tras el procesamiento de las muestras, en la que se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *APO-E* en pacientes con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer, obteniendo conclusiones y respuestas objetivas con respecto al planteamiento del problema de investigación.

Todas las etapas experimentales fueron realizados en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador-Quito. Las consultas bibliográficas, el procesamiento estadístico de los datos y la discusión de resultados fueron llevados a cabo tanto en la Escuela de Bioanálisis como en el Instituto Leopoldo Izquieta Pérez-Quito.

3.8. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

a. EQUIPOS

- ✓ Fluorómetro Qubit® 2.0 ds-DNA HS.
Marca: INVITROGEN; Modelo: QUBIT 2.0; Ref. Q-32866; Serie: 1202005498.
- ✓ Termociclador.
Marca: LABNET; Modelo: MULTIGENE OPTIMAX; Ref. TC-9610; Serie: 1202020.
- ✓ Transiluminador con luz ultravioleta.
Marca: INVITROGEN; Modelo: BLUE-LIGHT TRANS-ILUMINATOR; Serie: 13110317.
- ✓ Microcentrífuga.
Marca: LABNET; Modelo: C-2500; Ref. G-6600; Serie: P-101004.
- ✓ Cámara de flujo laminar.
Marca: C.B.S SCIENTIFIC; Modelo: P-036202; Serie: 004000400.
- ✓ Termobloque.
Marca: DRY-BATH; Modelo: DB-005; Serie: 919622.
- ✓ Cámara electroforética.
Marca: C.B.S SCIENTIFIC; Modelo: MGU-502T; Serie: 006918.

b. MATERIALES Y REACTIVOS

- ✓ Puntas para pipetas con filtro volumen 0.1-10 µl; Marca: QIAGEN.
- ✓ Puntas para pipetas con filtro volumen 10-100 µl; Marca: QIAGEN.
- ✓ Puntas para pipetas con filtro volumen 100-1000 µl; Marca: QIAGEN.

- ✓ Microtubos volumen 1.5 ml; Marca: AXYGEN.
- ✓ Microtubos PCR volumen 0.2 ml; Marca: AXYGEN.
- ✓ Guantes de nitrilo; Marca: GENSKIN.
- ✓ Juego de 4 pipetas automáticas de volumen variable; Marca: LABNET.
- ✓ Galón de alcohol antiséptico (95 %).
- ✓ Paquete de toallas de papel.
- ✓ Jeringuillas de 5 ml.
- ✓ Kit de extracción de DNA PURELINK; Marca: INVITROGEN.
- ✓ Qubit dsDNA-HS Assay Kit; Marca: INVITROGEN.
- ✓ DNA Ladder 100 pb Trackit; Marca: INVITROGEN.
- ✓ DNA Ladder 50 pb Trackit; Marca: INVITROGEN.
- ✓ DNA Syber Safe-INVITROGEN.
- ✓ Agarosa 500 gramos (Ultra-Pure); Marca: INVITROGEN.
- ✓ Buffer TBE 10X-PROMEGA.
- ✓ Primers gen *APO-E* (forward y reverse). Marca: PROMEGA.
- ✓ Primers gen *APO-E* (forward y reverse). Marca: PROMEGA.
SECUENCIAS: Primer Forward: 5'-TCCAAGGAGCTGCAGGCGG-3'
Primer Reverse: 5'-GCTCGCGGATGGCGCTGA-3'
- ✓ Primers gen β -actina (forward y reverse). Marca: PROMEGA.
SECUENCIAS: Primer Forward: 5'-AGAAGGATTCCTATGTGGGCG-3'
Primer Reverse: 5'-CATGTCGTCCCAGTTGGTGAC-3'
- ✓ Enzima de restricción *Hha-I* (10 U/ μ l). Marca: PROMEGA.
- ✓ Go Taq® Green Master Mix (2X) - PCR. Marca: PROMEGA.

3.9 MÉTODOS Y TÉCNICAS EMPLEADAS

3.9.1 EXTRACCIÓN DEL ADN

Al encontrarse el ADN replegado en el interior del núcleo de la célula y unido a proteínas y otras sustancias en menor proporción, es necesario seguir los siguientes procedimientos para su liberación y posterior extracción: ruptura de las células, eliminación de proteínas, eliminación de ARN y concentración del ADN. (Invitrogen, 2012; Navarro, 2010).

A. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA

De los 3 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA al 5 %, se tomaron 100 μ l para iniciar el procedimiento de extracción de ADN mediante el estuche comercial para

extracción *DNA PURELINK GENOMIC* de la casa comercial Invitrogen, de acuerdo al protocolo indicado en este. (VER FIGURA 3.1).

- a) Colocar en un tubo eppendorf estéril (con capacidad para 1.5 ml) 100 μ l de sangre total con 100 μ l de solución *PBS (Phosphate Buffer Saline)*.
- b) Agregar 20 μ l del reactivo 2 "*PROTEINASA K*" al tubo.
- c) Agregar 20 μ l del reactivo 3 "*RNAsa A*" al lisado, mezclar bien (vórtex) e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
- d) Agregar 200 μ l del reactivo solución buffer para lisado y unión, "*PURE-LINK GENOMIC LYSIS/BINDING BUFFER*", y mezclar bien (vórtex) para obtener una solución homogénea.
- e) Incubar a 55°C por 10 minutos.
- f) Agregar 200 μ l de etanol (96-100 %) al lisado. Mezclar bien (vórtex) por 5 segundos para obtener una solución homogénea.
- g) Proceder inmediatamente al paso de unión ADN, (*BINDING DNA*).

B. *BINDING DNA (UNIÓN ADN)*

- a) Agregar el lisado preparado (aproximadamente 640 μ l) a una columna nueva (*SPIN COLUMN*).
- b) Centrifugar la columna a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.
- c) Descartar y colocar la columna en un tubo de recogida (*COLLECTION TUBE*) que viene suministrado en el estuche.
- d) Proceder con el paso de lavado, *WASHING DNA*.

C. *WASHING DNA (LAVADO ADN)*

- a) Agregar 500 μ l de buffer para lavado 1, *BUFFER WASH 1*, previamente preparado con etanol.
- b) Centrifugar la columna a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.
- c) Descartar y colocar la columna (*SPIN COLUMN*) en un tubo de recogida (*COLLECTION TUBE*) nuevo.
- d) Agregar 500 μ l de solución buffer para lavado 2, *BUFFER WASH 2*, previamente preparado con etanol.

- e) Centrifugar la columna a máxima velocidad (15000 rpm) por 3 minutos a temperatura ambiente. Descartar el tubo de recogida (*COLLECTION TUBE*).
- f) Proceder con el paso de elución, *ELUTING DNA*.

D. *ELUTING DNA (ELUCIÓN ADN)*

- a) Colocar la columna, *SPIN COLUMN*, en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml.
- b) Agregar 105 μ l de la solución buffer para elución, *PURELINK GENOMIC ELUTION BUFFER*, a la columna (verificar el volumen de elución necesario según el ensayo).
- c) Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- d) Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
- e) Para obtener más ADN, desarrollar un segundo proceso de elución usando el mismo volumen del buffer de elución como primera elución en otro tubo eppendorf estéril de 1,5 ml.
- f) Centrifugar la columna a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente proceder a su cuantificación empleando el fluorómetro QUBIT® 2.0.

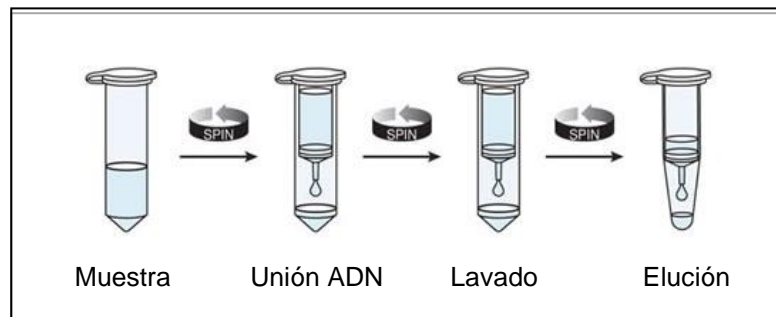


FIGURA 3.1 Método de extracción de ADN mediante el estuche DNA PURELINK GENOMIC en tres pasos: unión y liberación del ADN (*BINDING*), eliminación de sales, proteínas y otros componentes interferentes (*WASHING*) y extracción y concentración del ADN final (*ELUTION*). (Invitrogen, 2012).

3.9.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Para la cuantificación del ADN extraído se utilizó el estuche *Qubit dsDNA-HS Assay Kit* y el fluorómetro QUBIT® 2.0 siguiendo el siguiente procedimiento:

A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

La preparación de la solución de trabajo y las soluciones estándar (*estándar 1* y *estándar 2*) para la calibración del fluorómetro previo a la lectura de muestras, se realizó de acuerdo al siguiente protocolo de trabajo: (ver FIGURA 3.2)

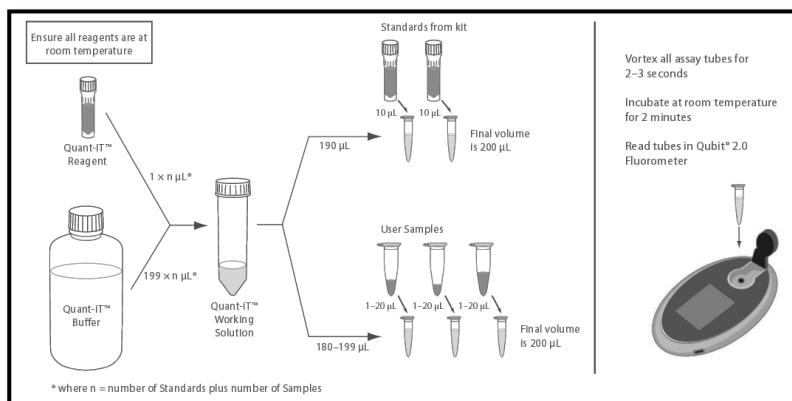


FIGURA 3.2 Protocolo de trabajo para preparación de soluciones estándar previo a la cuantificación ADN en el fluorómetro QUBIT® 2.0. (Invitrogen, 2010).

- Para preparar la solución de trabajo: realizar una dilución 1:200 del *reactivo* dsDNA HS (*high sensitivity*) en el *buffer* dsDNA HS, para lo cual se deberá tomar 199 µl del *buffer* dsDNA HS y agregar 1 µl del *reactivo* dsDNA HS para un volumen final de 200 µl equivalentes para una reacción (*se realizará el cálculo respectivo para el número total de muestras*).
 - Para la solución estándar 1: tomar 190 µl de la solución de trabajo y agregar 10 µl del *reactivo estándar 1* y mezclar en el vórtex de 2 a 3 segundos (*evitar la formación de burbujas*).
 - Para la solución estándar 2: tomar 190 µl de la solución de trabajo y agregar 10 µl del *reactivo estándar 2* y mezclar en el vórtex de 2 a 3 segundos (*evitar la formación de burbujas*).
- Mezclar las soluciones preparadas anteriormente en el vórtex de 2 a 3 segundos evitando la formación de burbujas.
 - Incubar 2 minutos a temperatura ambiente y proceder a la lectura en el fluorómetro QUBIT® 2.0.
- Para la preparación de las muestras tomar 199 µl de la solución de trabajo y agregar 1 µl del *ADN* obtenido en la extracción para un volumen final de 200 µl

equivalentes para una reacción (*se realizará el cálculo respectivo para preparar la solución de trabajo según el número de muestras*).

- Mezclar la solución preparada anteriormente en el vórtex de 2 a 3 segundos evitando la formación de burbujas.
- Incubar 2 minutos a temperatura ambiente y proceder a la lectura en el fluorómetro QUBIT® 2.0.

B. LECTURA DEL ADN EN EL QUBIT® 2.0

- a) Encender el fluorómetro QUBIT® 2.0 y en la pantalla de inicio seleccionar el ensayo “*cuantificación de ADN*” y a continuación la opción *dsDNA HS (High Sensitivity)*. (FIGURA 3.3).

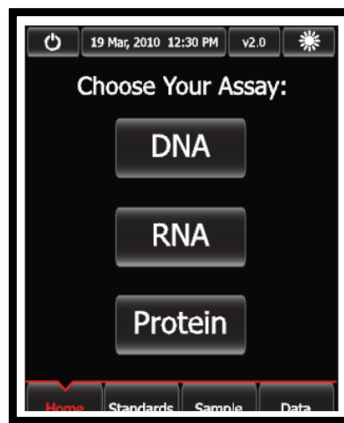


FIGURA 3.3 Fluorómetro QUBIT® 2.0: Parámetros de cuantificación para ensayos en ADN, ARN y proteínas. (Invitrogen, 2012).

- b) Leer las soluciones estándares de trabajo (*estándar 1 y estándar 2*) en el equipo para generar la curva de calibración *fluorescencia vs concentración* previo a la lectura de las muestras. (FIGURA 3.4 y 3.5). *Nota: la solución estándar 2 debe ser mucho más alta que la solución estándar 1 y la concentración de las muestras debe estar entre la concentración de las dos soluciones estándar. En caso de que los estándares no sean preparados correctamente el equipo no permitirá leer las muestras.*

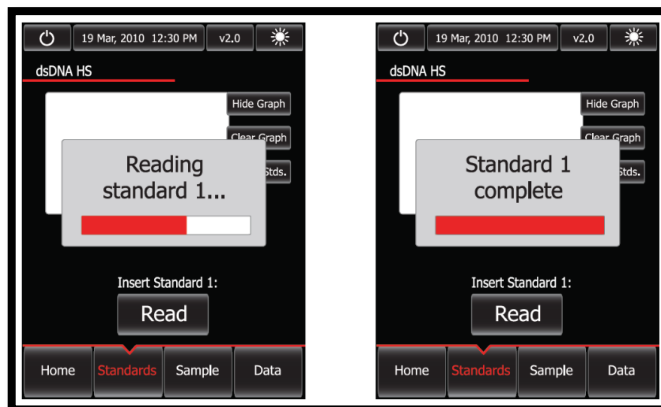


FIGURA 3.4 Fluorómetro QUBIT[®] 2.0: Lectura de las soluciones estándar para la calibración del equipo previo a la lectura de muestras. (Invitrogen, 2012).

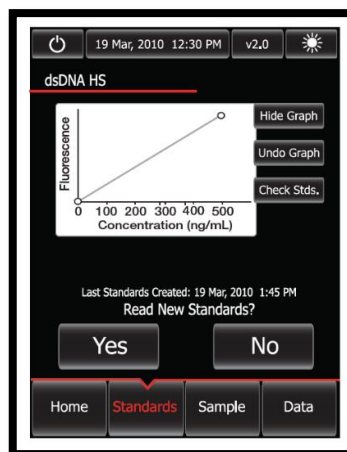


FIGURA 3.5 Fluorómetro QUBIT[®] 2.0: Curva de calibración *fluorescencia vs concentración* de las soluciones estándar previo a la lectura de muestras (*la solución estándar 2 debe ser mucho más alta que la solución estándar 1*). (Invitrogen 2012).

- c) Una vez que las soluciones estándares hayan sido leídas se procederá a la lectura de todas las muestras. (FIGURA 3.6). *Nota: En caso de que no se realice la lectura de todas las muestras en el mismo día, se deberán preparar nuevas soluciones estándar, leerlas en el equipo y proceder a la lectura de las muestras restantes.*



FIGURA 3.6 Fluorómetro QUBIT® 2.0: Lectura de muestras en el equipo (la concentración del ADN estará dada en ng/ml). (Invitrogen 2012).

- d) El equipo QUBIT® 2.0 tiene incorporado un dispositivo USB en el que se almacena la información de todas las lecturas realizadas, lo que permite copiar esta información y trabajarla en un computador para codificarla y completar con los datos de los pacientes, en MSOffice-Excel. (FIGURA 3.7).

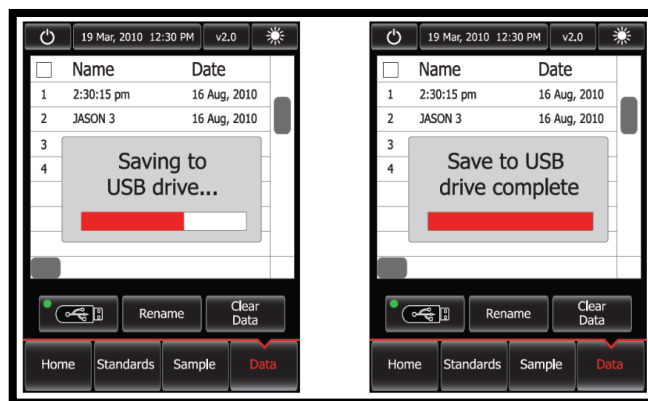


FIGURA 3.7 Fluorómetro QUBIT® 2.0: Almacenamiento de la información obtenida (concentración de las muestras) en el dispositivo USB incorporado en el equipo. (Invitrogen 2012).

3.9.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por Kary Mullis en 1983, es una técnica para la síntesis *“in vitro”* de secuencias específicas de ADN, permitiendo la obtención de múltiples copias de un fragmento a partir del ADN original. Para llevar a cabo este método se necesitan los siguientes componentes:

- ✓ El ADN molde a partir del cual se quiere obtener una copia de un fragmento, es decir, el ADN que se desea amplificar.
- ✓ Una enzima (ADN polimerasa) capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde. La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa.
- ✓ Los cebadores que se encargarán de delimitar el fragmento a amplificar; las enzimas ADN polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de ADN. Son necesarios por tanto moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de ADN de cadena sencilla. Estas moléculas son los cebadores o *primers* de la reacción.
- ✓ Los nucleótidos libres: las enzimas ADN polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs).

La PCR comprende un proceso de tres pasos, designados como un ciclo:

- A. Desnaturalización,
- B. Hibridación, y
- C. Elongación,

repitiéndose este ciclo un número específico de veces (generalmente entre 30 y 40 ciclos). Los cambios de temperatura constituyen la base para que se completen los pasos necesarios. (Navarro, 2010; Oddo, 2003; Pastor, 2004).

A. DESNATURALIZACIÓN

En esta etapa, el calor separa la hebra de ADN en dos cadenas y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 95°C. (FIGURA 8-A)

Puesto que los enlaces de hidrógeno que unen las bases son débiles, estos se rompen a altas temperaturas, mientras que los enlaces entre fosfatos y desoxirribosa, que son

enlaces covalentes más fuertes, permanecen intactos. (Navarro, 2010; Oddo, 2003; Pastor, 2004).

B. HIBRIDACIÓN

La hibridación comprende un descenso de la temperatura para que los primers o cebadores, creados a partir de una hebra única de ADN, marquen el final de la secuencia diana uniéndose por complementariedad al ADN molde y replicando la secuencia diana con alta especificidad. Las temperaturas habituales en esta fase están comprendidas entre 35 y 60°C. (FIGURA 8-B)

C. ELONGACIÓN

Una vez que los cebadores se han unido a las secuencias complementarias de ADN, la temperatura se eleva alrededor de 72°C permitiendo que la enzima Taq polimerasa replique las cadenas de ADN. (FIGURA 8-C)

La Taq ADN polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores, creando una doble tira a partir de cada una de las hebras individuales. Esta enzima es una ADN polimerasa recombinante termoestable del organismo *Thermus aquaticus*, que comienza el proceso de síntesis en la región marcada por los cebadores y sintetiza una nueva hélice de ADN de doble hebra, ambas idénticas al original, para facilitar la unión de los nucleótidos complementarios en el extremo 3' del cebador que quedan libres en la solución (dNTPs). (Navarro, 2010; Oddo, 2003; Pastor, 2004).

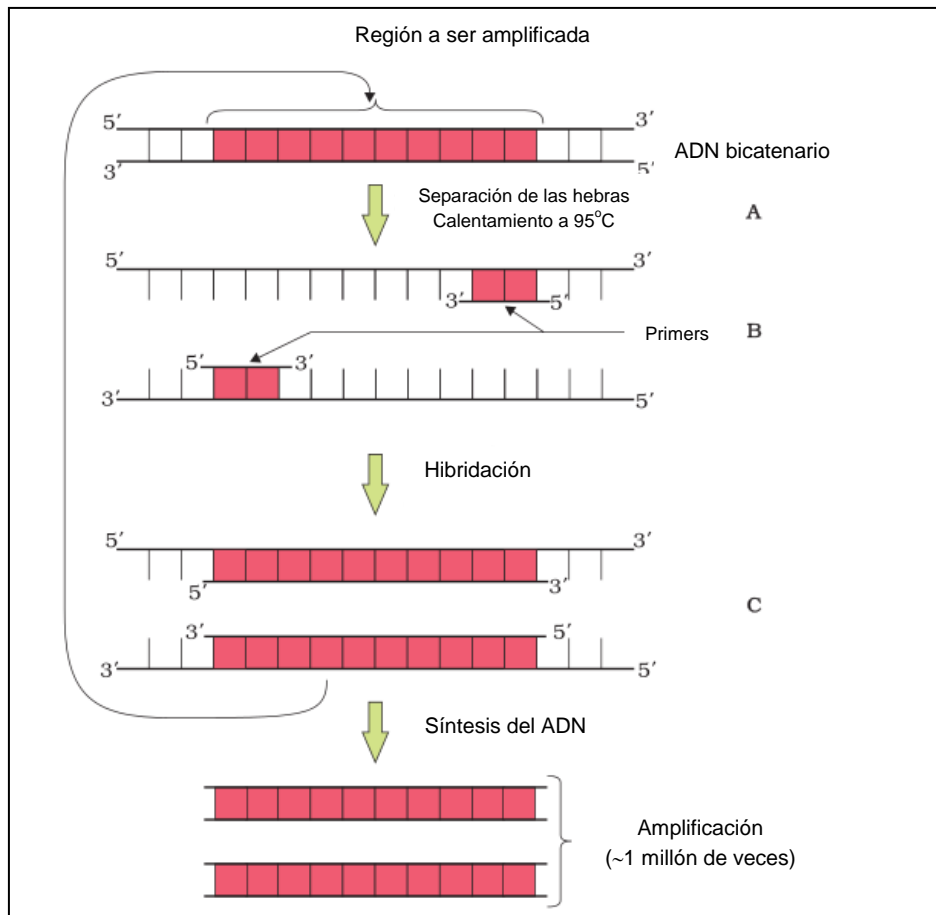


FIGURA 3.8 Etapas de la PCR: **A.** *Desnaturalización* (separación de la hebra de ADN mediante calentamiento), **B.** *Hibridación* de los *primers* en regiones específicas, y **C.** *Elongación* (extensión de los primers por la síntesis de ADN mediada por la Taq polimerasa). (Voet 2010).

3.9.3.1 PROCEDIMIENTO PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó amplificando el exón 4 del gen de la Apolipoproteína-E mediante el uso de cebadores y protocolos específicos. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2 % en TBE y los fragmentos obtenidos se visualizaron mediante el transiluminador UV-Invitrogen. (Navarro, 2010; Oddo, 2003; Pastor, 2004).

Inicialmente se realizó la búsqueda de la secuencia del gen *APO-E* en la base virtual NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (FIGURA 3,9), luego de lo cual se verificó el tamaño de los fragmentos a amplificar y la secuencia de los cebadores a sintetizar. (FIGURA 3.10 y FIGURA 3.11)

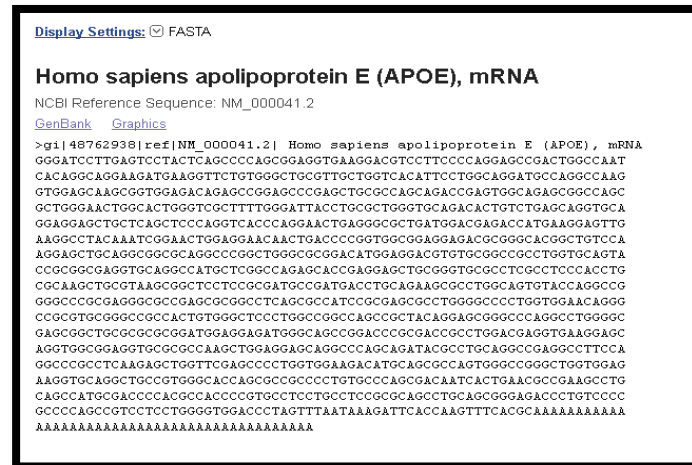


FIGURA 3.9 Secuencia del gen *APO-E*.

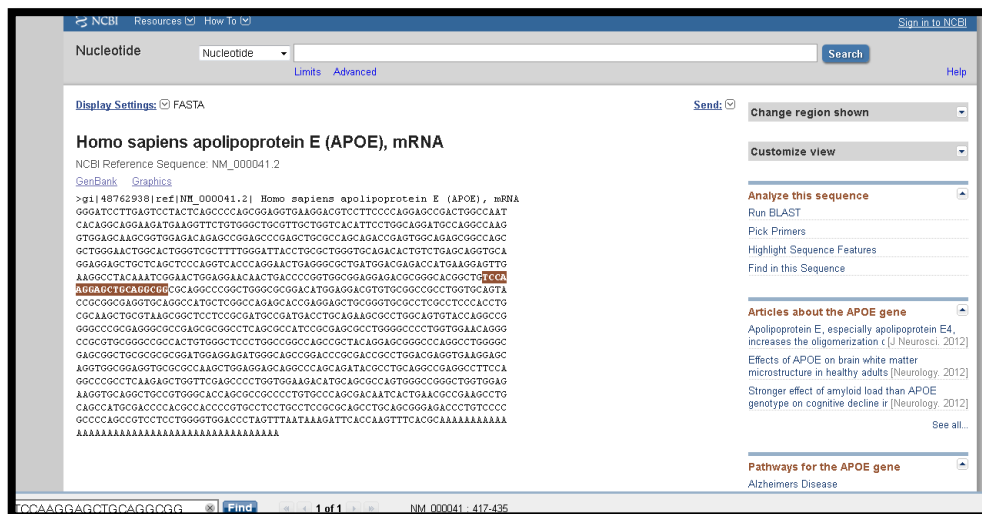


FIGURA 3.10 Búsqueda de los *primers* para el gen *APO-E*.

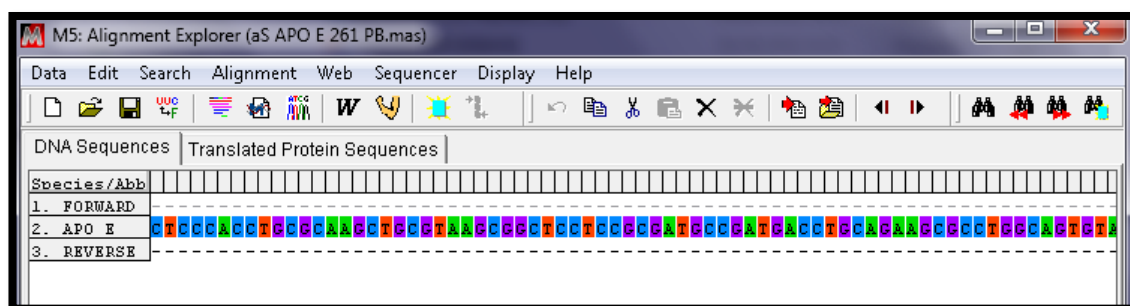


FIGURA 3.11 Alineamiento de la secuencias para el gen *APO-E*.

PRIMERS Y ESTABILIZACIÓN

Los *primers* usados para la amplificación de los fragmentos del gen *APO-E* fueron:

Primer Forward: 5'-TCCAAGGAGCTGCAGGCGG-3'

Primer Reverse: 5'-GCTCGCGGATGGCGCTGA-3'

Para la estabilización de cada *primer*, se siguió el siguiente procedimiento:

- ✓ A partir de la concentración de los *primers* liofilizados:

Primer Forward: T_m (50 mM Na⁺) = 35.1 nM.

Primer Reverse: T_m (50 mM Na⁺) = 37.3 nM.

- ✓ Se calculó el volumen de agua requerido para obtener una concentración de 100 μM:

$$35.1 \text{ nmoles} \times \frac{1000 \text{ pmoles}}{1 \text{ nmol}} \times \frac{1 \mu\text{l}}{100 \text{ pmoles}} = 351 \mu\text{l}$$

$$37.3 \text{ nmoles} \times \frac{1000 \text{ pmoles}}{1 \text{ nmol}} \times \frac{1 \mu\text{l}}{100 \text{ pmoles}} = 373 \mu\text{l}$$

- ✓ Agregar al *primer forward* (de concentración 35.1 nM), 351 μl de agua calidad miliQ en un tubo eppendorf y mezclar. Esta constituye la solución madre o stock del *primer forward* con una concentración de 100 μM.
- ✓ Del mismo modo agregar al *primer reverse* (de concentración 37.3 nM), 373 μl de agua calidad miliQ en un tubo eppendorf y mezclar. Esta constituye la solución madre o stock del *primer reverse* con una concentración de 100 μM.
- ✓ Una vez reconstituidos los *primers* tanto *forward* como *reverse*, en un tubo eppendorf por separado, se tomaron 10 μl de cada solución (concentración 100 μM) y con agua miliQ, se aforaron a un volumen de 100 μl para obtener soluciones de trabajo con una concentración final de 10 μM.

La fórmula utilizada para calcular el volumen de solución madre o stock requerida para obtener las soluciones de trabajo con una concentración final de 10 μM fue la siguiente:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$100 \mu\text{M} \times V1 = 10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{l}$$

$$V1 = \frac{10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{l}}{100 \mu\text{M}} = 10 \mu\text{l}$$

- ✓ Finalmente las soluciones preparadas fueron conservadas a una temperatura de -15°C .

El mismo procedimiento se llevó a cabo para la amplificación de los fragmentos con el gen control de β -actina, utilizando los siguientes *primers*: (FIGURAS 3.12 a 3.14)

Primer Forward: 5' - AGAAGATTCTATGTGGGCG-3'

Primer Reverse: 5' - CATGTCGTCCCAGTTGGTGAC-3'

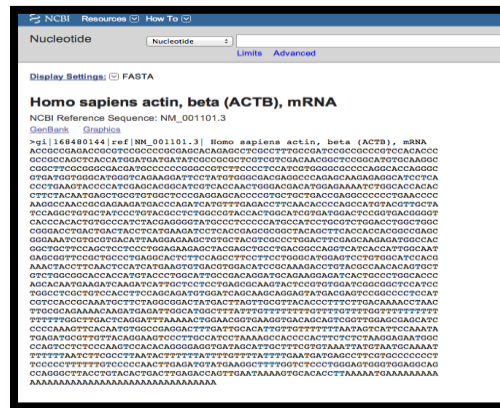


FIGURA 3.12 Secuencia del gen β -actina.

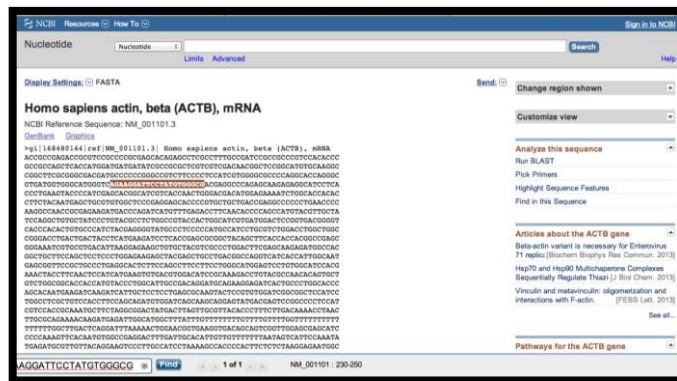
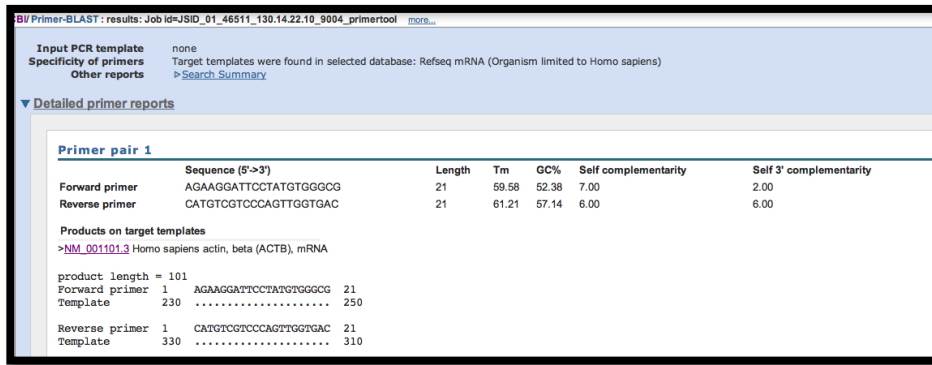


FIGURA 3.13 Búsqueda de los *primers* para el gen de la β -actina.



Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: Search Summary

▼ Detailed primer reports

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGAAGGATTCCTATGTGGGCG	21	59.58	52.38	7.00	2.00
Reverse primer	CATGTCGTCCCACTGGTGAC	21	61.21	57.14	6.00	6.00

Products on target templates
 >NM_001101.3 Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA

product length = 101
 Forward primer 1 AGAAGGATTCCTATGTGGGCG 21
 Template 230 250
 Reverse primer 1 CATGTCGTCCCACTGGTGAC 21
 Template 330 310

FIGURA 3.14 Control del par de *primers* para el gen de β -actina.

3.9.3.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN APO-E

Para la amplificación de fragmentos específicos de ADN se utilizó PCR convencional. Se utilizaron alícuotas de 200 ng/ μ l de ADN íntegro (previamente cuantificado).

Las reacciones se llevaron a cabo en microtubos de 0,5 ml en un volumen total de 25 μ l para cada muestra. La mezcla de reacción para cada tubo comprende: 1,5 μ l de ADN total, 12,5 μ l de la Go Taq® Green Master Mix 2X, 9 μ l de agua calidad miliQ, 1 μ l de primer *Forward* (F) y 1 μ l de primer *Reverse* (R). (TABLA 3.1). Para el control negativo se utilizaron todos los componentes antes mencionados excepto el ADN total, y para el control positivo se tomó como referencia una muestra que tenga presencia del alelo $\epsilon 2\epsilon 4$, característico de la EA en su variante tardía.

MIX-PCR

	Volumen
Go Taq Green Master Mix	12,5 μl
Primer <i>Forward</i>	1,0 μl
Primer <i>Reverse</i>	1,0 μl
ADN	1,5 μl
H₂O	9,0 μl
TOTAL	25,0 μl

TABLA 3.1 Mix utilizado para la realización de la PCR para el gen de la APO-E con un volumen final de 25 μ l.

En el termociclador el punto de partida es la desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos. Los 36 ciclos posteriores comprenden: 1 minuto a 95°C (denaturalización), 1 minuto a 65°C (hibridación), 2 minutos a 70°C (extensión). El paso final de elongación son 10 minutos a 72°C. (TABLA 3.2).

PROTOCOLO TERMOCICLADOR

	Temperatura	Tiempo
Denaturación Inicial	95°C	5 minutos
Denaturación	95°C	1 minuto
Hibridación	65°C	1 minuto
	70°C	2 minuto
Elongación	72°C	10 minutos
	36 ciclos	
Incubación	4°C α	

TABLA 3.2 Programación de temperaturas en el termociclador para el gen de la APO-E en cada una de las etapas de la PCR.

3.9.3.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN CONTROL DE β -ACTINA

La β -actina es utilizada como gen control para reacciones de PCR a partir de ADN genómico. Este gen también llamado “*housekeeping gene*”, se expresa en niveles relativamente constantes en todas las células humanas participando en el mantenimiento de las funciones celulares del organismo. (Gilliland, 1990; Glare, 2002; Voet, 2007).

Mediante el gen control de β -actina se comprueba: si es que la cantidad de ADN fue la correcta, la integridad y calidad del material genético de partida, y si hubo o no algún tipo de contaminación en alguno de los procedimientos anteriores. (Voet, 2007).

Para la amplificación se utilizaron alícuotas de 200 ng/ μ l de ADN íntegro cuantificado para la amplificación de fragmentos de ADN con el gen control de β -actina. Las reacciones se llevaron a cabo en microtubos de 0,5 ml en un volumen total de 25 μ l para cada muestra. La mezcla de reacción para cada tubo comprende: 1,5 μ l de ADN total, 12,5 μ l de la Go Taq® Green Master Mix 2X, 9 μ l de agua calidad miliQ, 1 μ l de primer *Forward* (F) y 1 μ l de primer *Reverse* (R). (TABLA 3.3). Para el control negativo se

utilizaron todos los componentes antes mencionados excepto el ADN total y para el control positivo se tomó como referencia una muestra con ADN íntegro previamente cuantificado.

MIX-PCR

	Volumen
Go Taq Green Master Mix	12,5 µl
Primer <i>Forward</i>	1,0 µl
Primer <i>Reverse</i>	1,0 µl
ADN	1,5 µl
H₂O	9,0 µl
TOTAL	25,0 µl

TABLA 3.3 Mix utilizado para la realización de la PCR para el gen control de β -actina.

En el termociclador el punto de partida es la desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos. Los 30 ciclos posteriores comprenden: 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (hibridación), 30 segundos a 72°C (extensión). El paso final de elongación son 10 minutos a 72°C. (TABLA 3.4).

PROTOCOLO TERMOCICLADOR

	Temperatura	Tiempo
Denaturación Inicial	95°C	5 minutos
Denaturación	94°C	30 segundos
Hibridación	60°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
Elongación	72°C	10 minutos
	30 ciclos	
Incubación	4°C α	

TABLA 3.4 Programación de temperaturas en el termociclador para el gel control de β -actina en cada una de las etapas de la PCR.

Una vez amplificados los productos de la PCR, estos se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, visualizándose fragmentos de 259 pares de bases correspondientes al exón 4 del gen *APO-E* y de 101 pares de bases para el gen control de β -actina.

3.9.4 ELECTROFORESIS

La electroforesis confiere la migración de moléculas bajo la influencia de un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (papel o en celulosa) o mediante una matriz porosa (electroforesis en gel) dependiendo de la carga eléctrica de las moléculas y de su masa. (Voet, 2007).

Para la electroforesis se utilizó agarosa pura. Los geles fueron realizados en base al tamaño del amplicón, tanto para el gen *APO-E* como para el control con β -actina (259 y 101 pares de bases respectivamente).

A. PREPARACIÓN GEL DE AGAROSA

- a. Gel de agarosa al 2 %: pesar 2 g de agarosa en polvo y disolver en 100 ml de TBE (*Buffer Tris Borato EDTA*) 1X, en un vaso de precipitación.
- b. Fundir la solución en el microondas y dejar por aproximadamente 5 minutos a potencia media, agitando en cada minuto el vaso de precipitación para que la solución no se evapore y para evitar la formación de grumos.
- c. Dejar enfriar la suspensión hasta que alcance unos 60°C aproximadamente.
- d. Agregar 1 μ l de *syber safe* por cada 10 ml de TBE 1X (10 μ l en total) a la solución y mezclar.
- e. Verter la solución de agarosa en el molde cuidando que no ingresen burbujas, verificando que la cámara esté equilibrada (la burbuja debe encontrarse en el centro del diámetro de control) y que los peines están correctamente colocados.
- f. Gelificar el gel por aproximadamente 30 minutos hasta que se polimerice.
- g. Retirar los peines cuidadosamente, tomar el gel con la base y colocarlo en la cámara de electroforesis (verificar que los pocillos estén cerca del cátodo o polo negativo).

B. SIEMBRA EN EL GEL

- a) Llenar la cámara de electroforesis con solución TBE 1X (aproximadamente 700 ml de acuerdo al tamaño de la cámara) verificando que dicha solución lo cubra completamente.
- b) Colocar 5 μ l del producto de la PCR (muestras), 5 μ l de los controles negativo y positivo, y 4 μ l de los *ladders* en cada uno de los carriles del gel en la cámara de electroforesis (de preferencia los *ladders* se colocarán en los extremos de cada gel).
- c) Ajustar los electrodos tanto positivo (color rojo) como negativo (color negro).
- d) Dejar correr el gel en la cámara por 45 minutos a 100 voltios.
- e) Apagar la cámara de electroforesis y transferir el gel al transiluminador UV.
- f) Encender el transiluminador UV y observar las bandas resultantes.
- g) Tomar una fotografía del gel para su posterior análisis e interpretación.

Al observar el gel en el transiluminador, se visualizaron los fragmentos correspondientes a la amplificación del exón 4 del gen *APO-E*, la del control de β -actina y el tamaño respectivo de sus amplicones (259 y 101 pb respectivamente).

3.9.5 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

La digestión se realizó mediante el corte con la enzima de restricción *Hha-I* (endonucleasa) para la visualización de los fragmentos correspondientes a los alelos del gen de la Apolipoproteína-E. (TABLA 3.5).

Las enzimas de restricción son proteínas que cortan las hebras de ADN de forma específica reconociendo una secuencia particular de nucleótidos. Dicha secuencia es denominada “sitio de restricción”, y al momento que la enzima reconoce dicha región se posiona sobre la molécula de ADN y corta la secuencia.

Existen tres sistemas de cortes enzimáticos describiéndose como enzimas de restricción tipo I, II y III, siendo la enzima *Hha-I* de tipo II por tener únicamente actividad de restricción (diferencia de las de tipo I y III que tienen actividad de restricción y metilación), por lo que el corte es efectuado exclusivamente en el sitio de reconocimiento de la secuencia.

Nomenclatura	Enzima	Significado
<i>H</i>	<i>Haemophilus</i>	Género de la bacteria
<i>Ha</i>	<i>haemolyticus</i>	Especie de la bacteria
I	La primera enzima identificada	Orden de identificación de la enzima en la bacteria.

TABLA 3.5 Nomenclatura de la enzima de restricción *Hha-I*.

Debido a su actividad de restricción la enzima *Hha-I* realizará cortes cohesivos (ruptura de dos enlaces fosfodiéster en la doble hebra **en forma escalonada** para dar lugar a dos extremos de ADN) en sitios específicos que contengan las siguientes bases en la secuencia: 5' GCGC 3' ; 3' CGCG 5' (FIGURA 3.15).

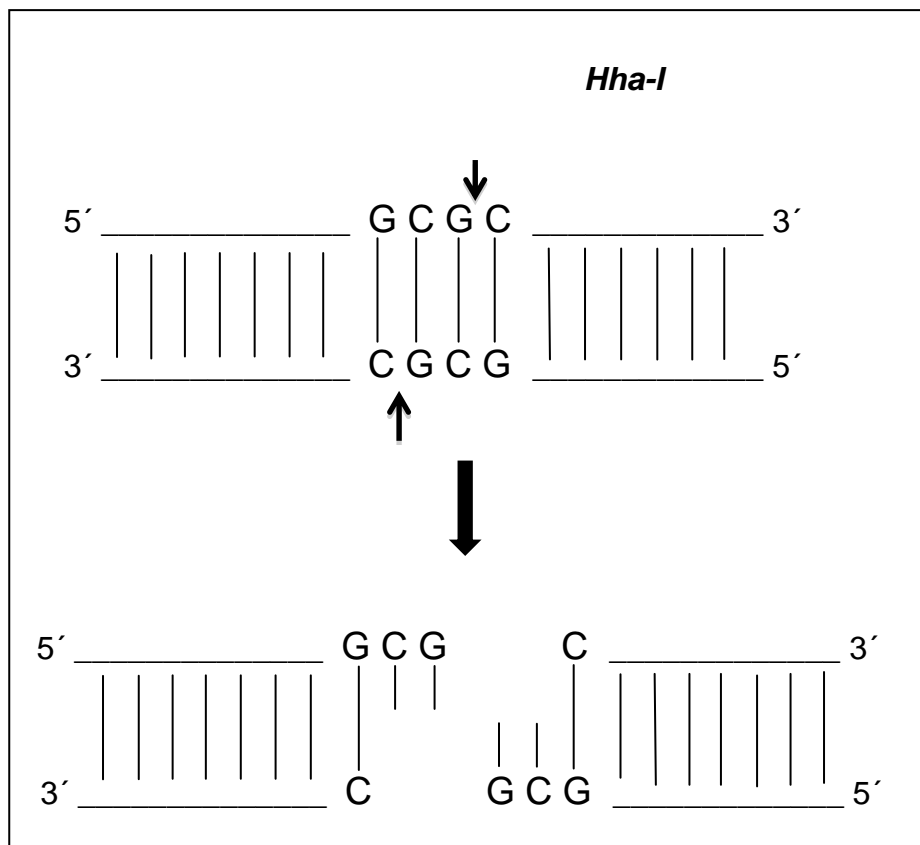


FIGURA 3.15 Corte de la secuencia específica de ADN mediada por la enzima de restricción *Hha-I*. (Invitrogen 2010).

Siendo la secuencia para el gen de la Apolipoproteína E la siguiente:

TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCAGGCCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTGTGCGGCCGCCTGGTGCAGT
ACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCACCTGCG
CAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCC
CGCGAGGGCGCCGAGCGCGGCC**TCAGCGCCATCCGCGAGC**

La enzima *Hha-I* realizará el corte en las siguientes regiones específicas:

TCCAAGGAGCTGCAG**SCGG**CGCAGGCCCGGCTGG**SCGC**GGACATGGAGGACGT**GTGC**GGCCGCCTGGTGCAGT
ACCGCGGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGT**SCGC**CTCGCCTCCACCT**GCG**
CAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAA**GCGC**CTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGCC
CGCGAGG**SCGC**CGA**SCGC**GGCC**TCA****SCGC****ATCCGCGAGC**

Las secuencias de nucleótidos en verde corresponden a los sitios donde se realizará el corte enzimático y las secuencias de nucleótidos en celeste corresponden al lugar de los posibles polimorfismos dependiendo de la proteína ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$), observándose los siguientes patrones para cada genotipo:

$\epsilon 2/\epsilon 2$: 91, 82 y 63 pb.

$\epsilon 2/\epsilon 4$: 91, 82, 72, 63 y 48 pb.

$\epsilon 3/\epsilon 4$: 91, 72, 63 y 48 pb.

$\epsilon 2/\epsilon 3$: 91, 82, 63 y 48 pb.

$\epsilon 3/\epsilon 3$: 91, 63 y 48 pb.

$\epsilon 4/\epsilon 4$: 72, 63 y 48 pb.

3.9.5.1 PROCEDIMIENTO DIGESTIÓN

Las reacciones se llevaron a cabo en microtubos eppendorf con capacidad para 0,5 ml, para un volumen final de cada muestra de 20 μ l. La mezcla de reacción para cada tubo comprende: 1 μ l de la enzima *Hha-I* (10 U/ μ l), 2,5 μ l del buffer M (10 X), 10,0 μ l del producto amplificado, y 6,5 μ l de agua calidad miliQ. (TABLA 3.6).

MIX-DIGESTIÓN

	Volumen
Enzima <i>Hha-I</i>	1,0 μl
Buffer M 10X	2,5 μl
ADN	10,0 μl
H₂O	6,5 μl
TOTAL	20,0 μl

TABLA 3.6 Mix utilizado en la digestión enzimática (volumen final de 20 μ l).

La reacción fue incubada a 37°C por 3 horas y sometida a electroforesis en gel de agarosa al 4 % por 50 minutos y con un voltaje de 100 para su posterior visualización en el transiluminador UV.

3.10 CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad se aplicó en cada una de las fases del análisis por el laboratorio, con énfasis en los puntos críticos de los mismos:

- ✓ Control de temperatura de los equipos: refrigeradora y termobloque para asegurar la estabilidad de la temperatura y evitar la degradación del ADN.
- ✓ Control de superficies y ambientes: limpieza de mesones de trabajo y cámara de flujo laminar de acuerdo a protocolos y la realización de control microbiológico de superficies y ambientes del área de realización de la parte experimental.
- ✓ Control de los procesos de amplificación y digestión: los controles, positivo y negativo, se utilizaron cada vez que se realizó la extracción del material genético de las muestras sanguíneas de los pacientes y que fueron sometidas a amplificación y digestión. Además los resultados de los mismos fueron comparados con los resultados sobre genotipos publicados en la literatura académica científica. Como control positivo se empleó una muestra obtenida de un paciente con EA, en la misma que se verificó la presencia de la patología mediante secuenciación, y como control negativo se empleó agua mili-Q en lugar

de material biológico. Para asegurar la confidencialidad de los resultados se trabajó cada muestra del paciente y controles por duplicado.

3.11 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Para asegurar la confidencialidad, se codificaron las muestras de cada paciente: este código y la información respectiva (datos del historial médico y resultados obtenidos en los análisis genético moleculares) se ingresaron a una hoja de cálculo (Microsoft Office-Excel, versión 2010) para facilitar el manejo de la misma. Esta base de datos se trasladó al programa estadístico SPSS Statistics, versión 2007, en el que se calcularon los estadísticos descriptivos respectivos de acuerdo a las variables en estudio, se obtuvieron las frecuencias, las tablas y gráficas para presentación de los resultados.

3.12 OPERACIONALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

VARIABLE	DEFINICIÓN	INSTRUMENTO	ESCALA	INDICADOR
Edad	Número de años cumplidos por el paciente al momento de la toma de muestra.	Formulario de datos del paciente.	Cuantitativa.	Media, desviación estándar, rango, IC: 95 %.
Antecedentes familiares	Constancia en la historia clínica de que algún miembro de la familia del paciente (de hasta tercer grado de consanguinidad) padece o padeció la enfermedad de Alzheimer.	Revisión de la historia clínica del paciente.	Cuantitativa.	$\% F.R. = \frac{\text{Pctes EA con antecedentes familiares de EA.}}{\text{Total pctes.}} \times 100$
Polimorfismos del gen APO-E	Se establecen 3 frecuencias alélicas ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$), y 6 polimorfismos posibles ($\epsilon 2\epsilon 2$, $\epsilon 2\epsilon 4$, $\epsilon 2\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 4$ y $\epsilon 4\epsilon 4$).	Estudio molecular PCR y digestión. (Se genotificarán los polimorfismos del gen APO-E).	Cuantitativa	$\% F.R. = \frac{\text{Pctes con presencia de cada polimorfismo.}}{\text{Total pctes analizados.}} \times 100$ $\% F.R. = \frac{\text{Pctes con presencia de cada alelo.}}{\text{Total pctes analizados.}} \times 100$
Enfermedad de Alzheimer, forma tardía	Presencia del alelo $\epsilon 4$, mayor probabilidad de manifestar la EA en su variante tardía con respecto a los demás alelos del gen APO-E.	PCR y digestión	Cuantitativa	$\% F.R. = \frac{\text{Pctes homocigotos para el genotipo E4/E4.}}{\text{Total pctes analizados}} \times 100$
Diagnóstico presuntivo	Es aquel que el médico tratante considera posible basándose en parámetros como datos obtenidos en la anamnesis y en los resultados de los exámenes neuropsicológicos.	Revisión del historial del paciente, exámenes físicos, antecedentes familiares, exámenes de imagen, etc.	Cuantitativa	$\% F.R. = \frac{\text{Pctes con Dgto presuntivo de la EA, variante tardía.}}{\text{Total pctes con Dgto de la EA.}} \times 100$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

A pesar de que la enfermedad de Alzheimer ocurre antes de los 65 años de edad (forma temprana), la variante tardía es la forma más común de la patología iniciándose a partir de los 65 años. El gen de susceptibilidad más asociado con esta variante es el de la Apolipoproteína E.

El análisis de polimorfismos en el gen de la APO-E es de gran importancia para establecer una relación entre sus alelos y genotipos con respecto a la enfermedad de Alzheimer en su variante tardía, pues la presencia de al menos un alelo $\epsilon 4$ indica una probabilidad de 3 a 4 veces mayor de desarrollar la enfermedad. (James, 2010; Rocchi, 2002; Holmes 2002).

4.1 CARÁCTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

Se recolectaron 100 muestras de pacientes, varones y mujeres, entre 55 y 90 años de edad, residentes de la ciudad de Quito y con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer en su variante tardía.

En las tablas 4.7 y 4.8. se indica la distribución de la muestra por centro de atención al pacientes (hospitales y hogares de ancianos) y género. Los pacientes seleccionados tuvieron una distribución similar en cuanto al centro de atención y dentro de estos, con una mayor frecuencia en el género femenino frente al masculino.

TABLA 4.7 Frecuencia de pacientes seleccionados por Hospital.

HOSPITALES					
	N	Hospital Julio Endara	Hospital Pablo Arturo Suárez	Hospital Carlos Andrade Marín	Hospital General de las Fuerzas Armadas
Femenino	26	6	3	13	4
Masculino	21	4	1	14	2
Total	47	10	4	27	6

Fuente: Base de datos
Elaborado por: Andrés Sarmiento

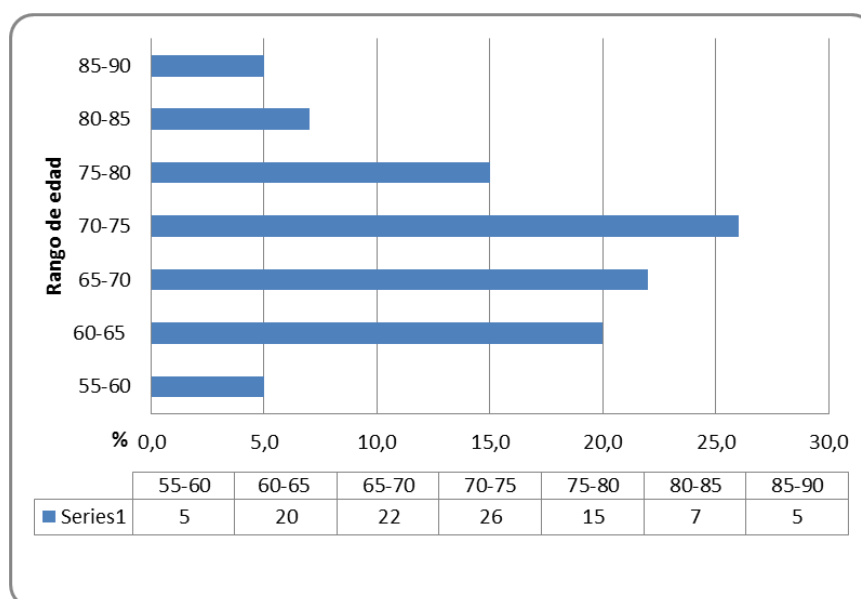
TABLA 4.8 Frecuencia de pacientes seleccionados por Hogar de ancianos.

HOGARES DE ANCIANOS					
	N	Sagrado Corazón de María	La Estancia de Otoño	Los Olivos	Nuevo Amanecer
Femenino	36	14	3	6	13
Masculino	17	5	1	2	9
Total	53	19	4	8	22

Fuente: Base de datos
Elaborado por: Andrés Sarmiento

En la gráfica 4.1, de acuerdo al rango de edad, se observa que las mayores frecuencias corresponden a los rangos que abarcan entre 60 y 80 años.

GRÁFICA 4.1 Frecuencia por rango de edad de los pacientes en estudio.



La edad promedio para los pacientes con diagnóstico presuntivo de EA fue de $71,6 \pm 10$ años, con una media mayor para el género femenino ($75,6 \pm 11,3$) frente al masculino ($67,5 \pm 9,9$). Al determinar las frecuencias para las variables antecedentes familiares de EA y años de educación, 18 de los 100 pacientes presentan antecedentes y en promedio han cursado $7,8 \pm 4,3$ años de estudio durante su vida. (Ver TABLA 4.9).

TABLA 4.9 Estadísticas descriptivas de la población estudiada.

Variable/Estadístico		n	%	\bar{x} (años)	DE (años)	Mínimo (años)	Máximo (años)
Edad	Femenino	64	64	75,6	11,3	55	90
	Masculino	36	36	67,5	9,9	55	83
	Total	100		71,6	10,0	55	90
Antecedentes familiares EA	Femenino	12	12				
	Masculino	6	6				
	Total	18					
Educación	Femenino	64	64	6,9	3,5	1	14
	Masculino	36	36	7,1	3,2	1	12
	Total	100		7,8	4,3	1	14

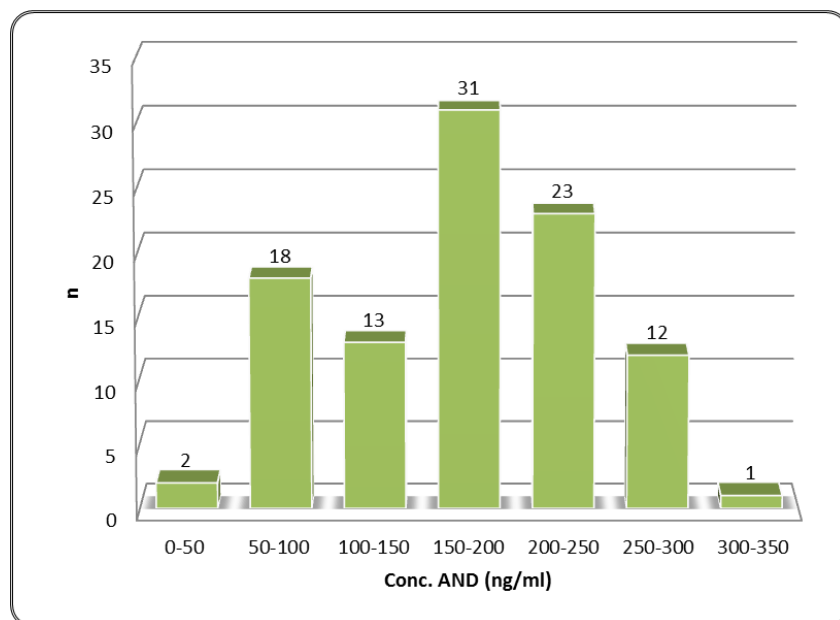
\bar{x} (Media), DE (Desviación Estándar)

Fuente: Base de datos
Elaborado por: Andrés Sarmiento

4.2 RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DEL ADN

Se obtuvieron concentraciones de ADN desde 61.5 a 341.5 ng/ml en las muestras analizadas, valores que se encontraron dentro del rango óptimo requerido por la técnica para la amplificación de los fragmentos correspondientes al gen de la Apolipoproteína E. (GRÁFICA 4.2).

GRÁFICA 4.2 Valores obtenidos en la cuantificación de ADN de las muestras biológicas analizadas en el fluorómetro QUBIT 2.0.



Nota: Para mantener la integridad del ADN, se conservaron las muestras a una temperatura de 4°C cuando fueron procesadas en períodos cortos de tiempo (ensayos realizados el mismo día) e inmediatamente almacenadas a -20°C, evitando que el ADN se vaya degradando e impidiendo de esta manera una disminución en el rendimiento de las reacciones enzimáticas posteriores.

4.2 RESULTADOS DE LA PCR

Las 100 muestras de ADN amplificaron el fragmento de 259 pares de bases correspondiente al exón 4 del gen de la Apolipoproteína E, confirmando la correcta amplificación mediante el control con β -actina (101 pares de bases). (FIGURA 4.1).

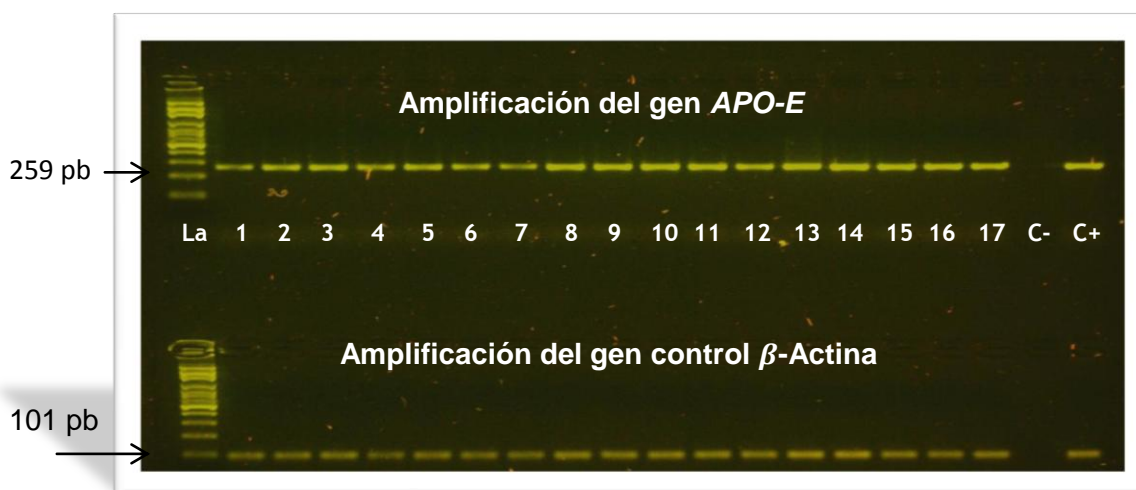
En el esquema 4.1 se detalla la distribución de las muestras en los pocillos del gel de agarosa.

De izquierda a derecha:

ESQUEMA 4.1 Distribución y volumen de las muestras en gel de agarosa para la amplificación del gen *APO-E*.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ladder 100-1500 pb (4 µl)	Muestra 1 Apo-E (5 µl)	Muestra 2 Apo-E (5 µl)	Muestra 3 Apo-E (5 µl)	Muestra 4 Apo-E (5 µl)	Muestra 5 Apo-E (5 µl)	Muestra 6 Apo-E (5 µl)	Muestra 7 Apo-E (5 µl)	Muestra 8 Apo-E (5 µl)	Muestra 9 Apo-E (5 µl)
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Muestra 10 Apo-E (5 µl)	Muestra 11 Apo-E (5 µl)	Muestra 12 Apo-E (5 µl)	Muestra 13 Apo-E (5 µl)	Muestra 14 Apo-E (5 µl)	Muestra 15 Apo-E (5 µl)	Muestra 16 Apo-E (5 µl)	Muestra 17 Apo-E (5 µl)	Control - Apo-E (5 µl)	Control + Apo-E (5 µl)

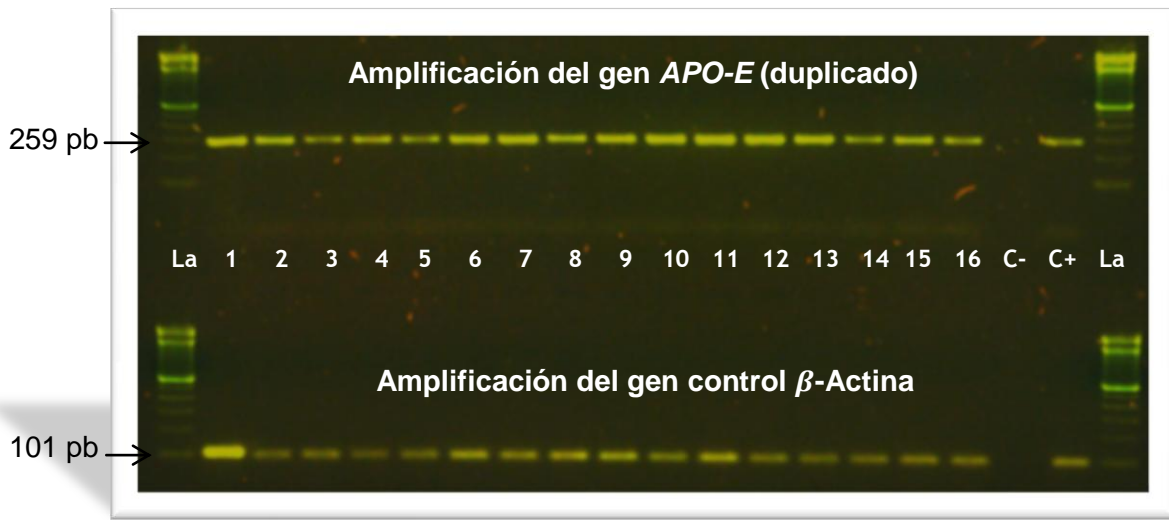
FIGURA 4.16 Amplificación del gen de la APO-E en gel de agarosa al 2 %.



Nota: Arriba: amplificación del gen de la Apolipoproteína E en gel de agarosa al 2 %. Pocillo 1: Ladder (100-1500 pb); pocillos 2-18: muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de EA (259 pb); pocillo 19: control negativo; pocillo 20: control positivo. Abajo: amplificación del gen control de β -actina (101 pb).

Para confirmar si la amplificación de los fragmentos obtenidos fue correcta, se trabajó por duplicado todas las muestras. En la Figura 4.2 se evidencia que los resultados fueron los mismos al realizar la réplica.

FIGURA 4.17 Amplificación del gen de la APO-E en gel de agarosa (duplicado).

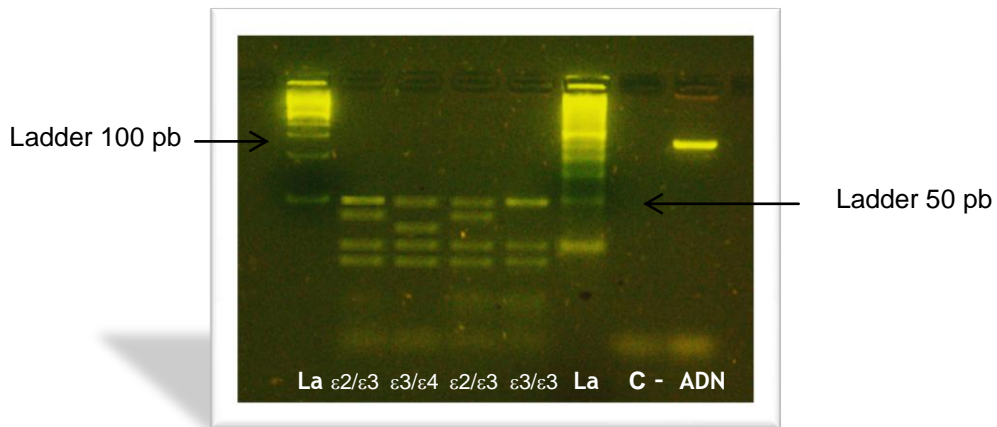


Nota: Arriba: Amplificación del gen de la Apolipoproteína E en gel de agarosa (duplicado). Pocillo 1: Ladder (100-1500 pb); pocillos 2-17: muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de EA (259 pb); pocillo 18: control negativo; pocillo 29: control positivo; pocillo 20: ladder (100-1500 pb). Abajo: amplificación del gen control de β -actina (101 pb).

4.4 RESULTADOS DE LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

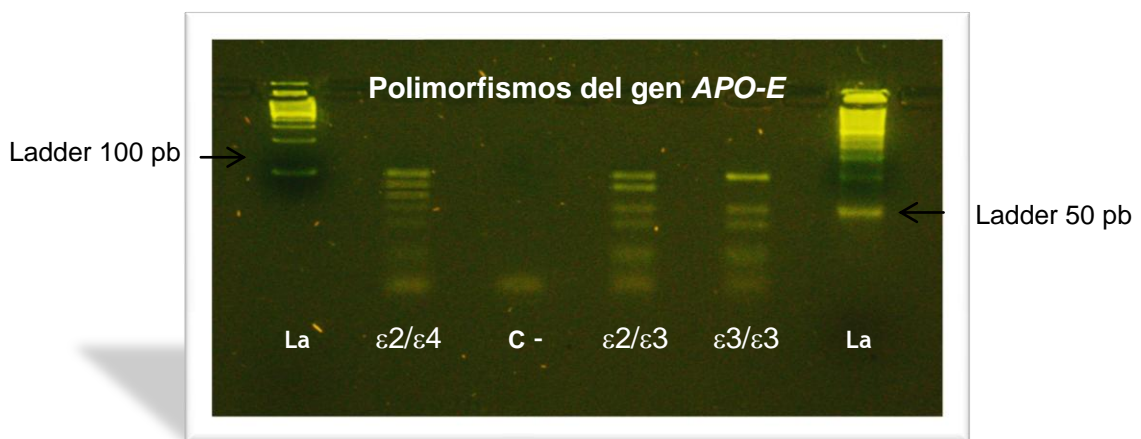
Una vez finalizada la amplificación de los fragmentos del gen *APO-E* se realizó el corte enzimático para la determinación de los polimorfismos posibles y sus isoformas respectivas. (FIGURA 4.3 y 4.4).

FIGURA 4.18 Visualización de polimorfismos del gen de la Apolipoproteína E mediante restricción enzimática en gel de agarosa al 4 %.



Nota: Pocillo 1: Ladder (100-1500 pb); pocillo 2: genotipo ϵ_2/ϵ_3 ; pocillo 3: genotipo ϵ_3/ϵ_4 ; pocillo 4: genotipo ϵ_2/ϵ_3 ; pocillo 5: genotipo ϵ_3/ϵ_3 ; pocillo 6: ladder (50 pb); pocillo 7: control negativo (sin ADN); pocillo 8: amplificación del fragmento de 259 pb del gen *APO-E* sin restricción enzimática.

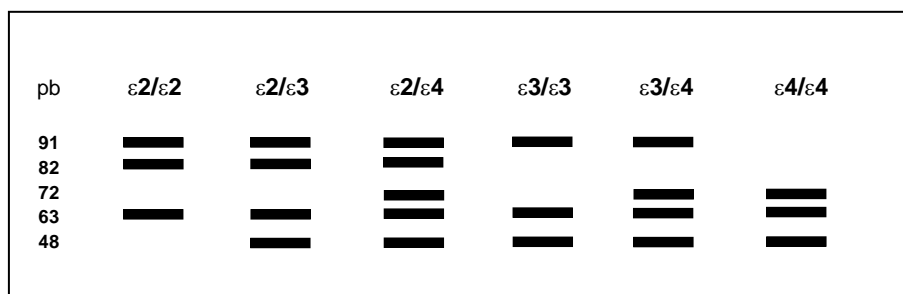
FIGURA 4.19 Visualización de polimorfismos del gen de la Apolipoproteína E mediante restricción enzimática en gel de agarosa al 4 %.



Nota: Pocillo 1: Ladder (100-1500 pb); pocillo 2: genotipo ϵ_2/ϵ_4 ; pocillo 3: control negativo (sin ADN); pocillo 4: genotipo ϵ_2/ϵ_3 ; pocillo 5: genotipo ϵ_3/ϵ_3 ; pocillo 6: ladder (50 pb).

A partir del siguiente patrón genético, Figura 4,5, y del polimorfismo obtenido se determinó el genotipo para cada muestras, así como las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos para el gen de la APO-E.

FIGURA 4.20 Patrones electroforéticos esperados para los diferentes genotipos.



Nota: Patrones electroforéticos esperados para los diferentes genotipos derivados de los alelos más comunes del gen de la APO-E ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$).

Las frecuencias genotípicas se calcularon dividiendo el número de pacientes con el genotipo específico para el total de individuos en estudio, en el que la suma de las frecuencias genotípicas obtenidas debe ser igual a 1. Las frecuencias alélicas del gen APO-E se obtuvieron de la relación entre el número de alelos específicos para el total de alelos en estudio, los que se tomaron como el doble del total ya que cada genotipo posee dos alelos.

En la Tabla 4.10 y Gráfica 4.3 se evidencia que el genotipo que presenta mayor frecuencia es el $\epsilon 3/\epsilon 3$ en el total de la muestra (83 %), seguido por el $\epsilon 3/\epsilon 4$ y el $\epsilon 2/\epsilon 4$, con el 9 % y el 7 %, respectivamente, mientras que para el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ aparece apenas un paciente (1 %) y de género femenino y no se encontraron pacientes con el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$.

TABLA 4.10 Frecuencias genotípicas encontradas según el polimorfismo del gen APO-E en varones y mujeres.

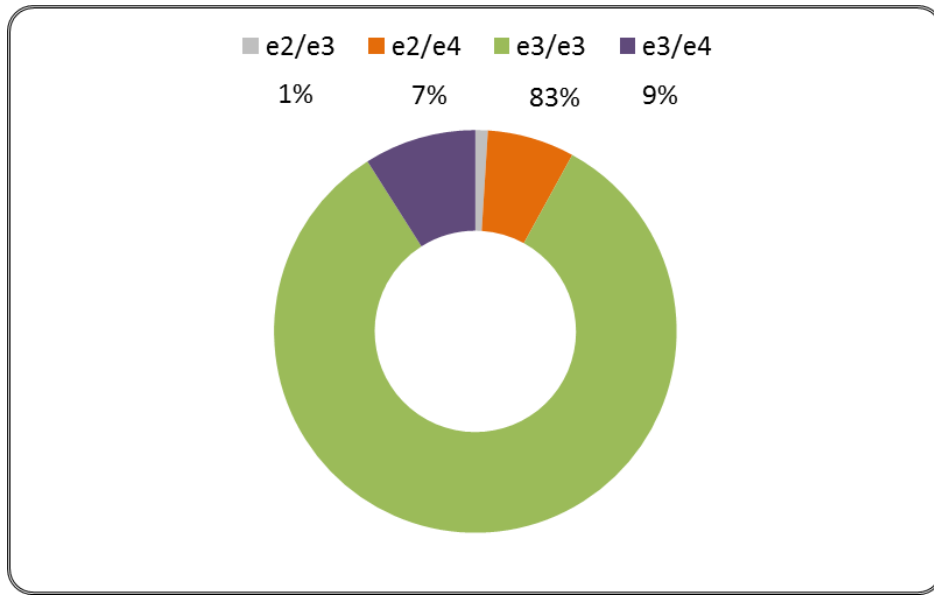
	N	Genotipos del gen APO-E					
		$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
Femenino	64	0 (0)*	1 (1.6)*	5 (7.8)*	56 (87.5)*	6 (9.4)*	0 (0)*
Masculino	36	0 (0)*	0 (0)*	2 (5.6)*	27 (75.0)*	3 (8.3)*	0 (0)*
Total	100	0 (0)	1(1.0)	7 (7.0)	83 (83.0)	9 (9.0)	0 (0)

Nota: *Porcentaje obtenido dentro del género

Fuente: Base de datos

Elaborado por: Andrés Sarmiento

GRÁFICA 4.3 Distribución de frecuencias genotípicas del polimorfismo del gen *APO-E* en la muestra.



Fuente: Base de datos
Elaborado por: Andrés Sarmiento

La tabla 4.11 resume la frecuencia de presentación del alelo $\epsilon 4$ en el total de la muestra y por género, un total de 16 pacientes (11 mujeres y 5 varones) con genotipos $\epsilon 2/\epsilon 4$ y $\epsilon 3/\epsilon 4$.

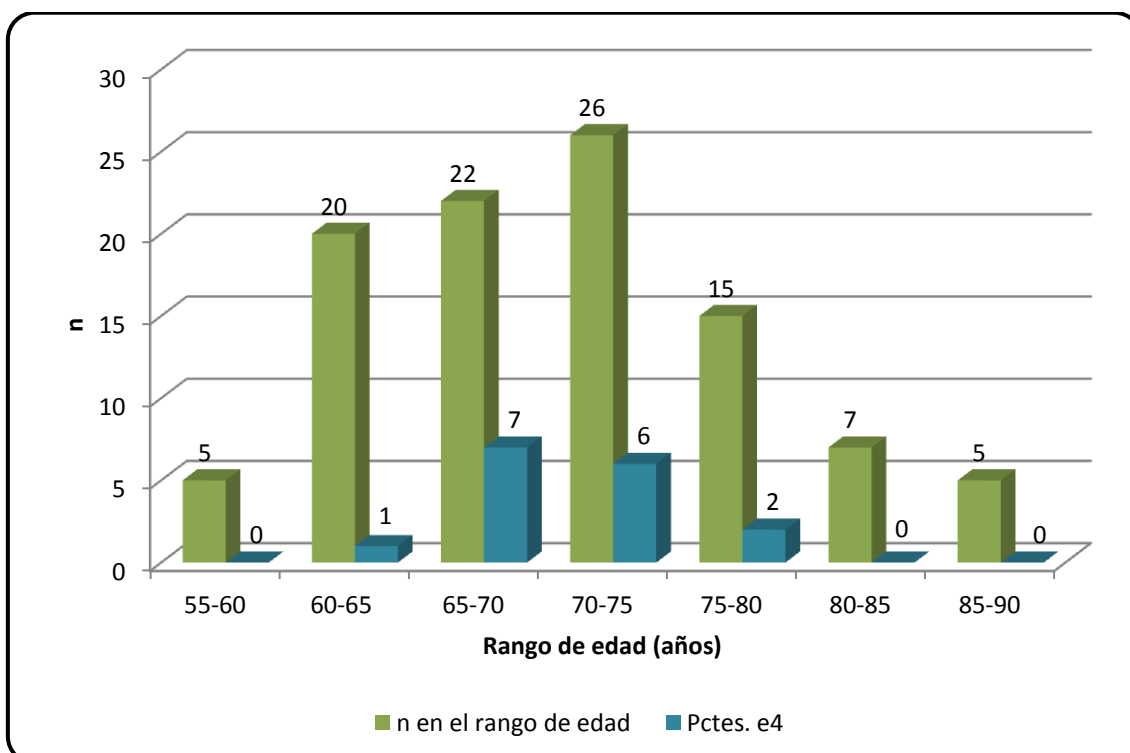
TABLA 4.11 Frecuencia de pacientes portadores del alelo $\epsilon 4$ del gen *APO-E*.

Individuos que presentan el alelo $\epsilon 4$ del gen <i>APO-E</i>				
	n	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Femenino	11	5	6	0
Masculino	5	2	3	0
Total	16	7	9	0

Fuente: Base de datos.
Elaborado por: Andrés Sarmiento

El alelo $\epsilon 4$ del gen *APO-E* fue encontrado en los pacientes que estuvieron entre los 60 y 80 años de edad, con una frecuencia similar y mayor al resto de rangos, en el rango de los 65 a los 70 años y de los 70 a los 75 años de edad. (GRÁFICA 4.4).

GRÁFICA 4.4 Número de pacientes que presentan el alelo $\epsilon 4$ del gen *APO-E* por rango de edad.



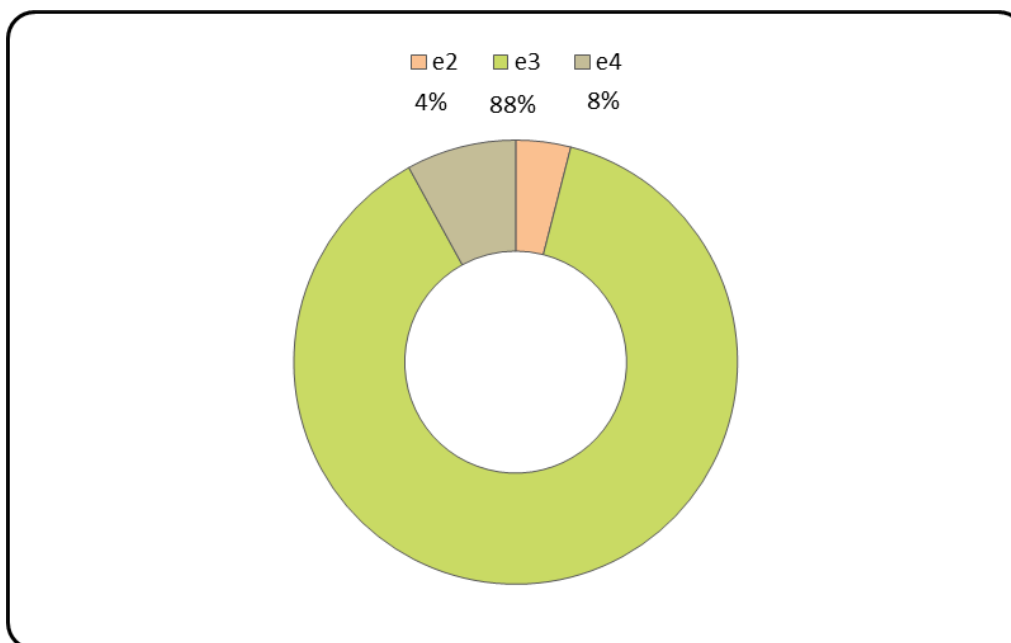
De acuerdo a los alelos del gen de la *APO-E* que se relacionan con EA, se encontró un 8% de pacientes con el alelo $\epsilon 4$, es decir existe un posible factor de riesgo para desarrollar EA, y lo contrario el 4 % presentaron el alelo $\epsilon 2$ que de acuerdo a los estudios publicados se considera un factor de protección, al reducir el riesgo de padecer EA. (TABLA 4.12 y FIGURA 4.5).

TABLA 4.12 Frecuencias alélicas del polimorfismo del gen *APO-E* en varones y mujeres con diagnóstico presuntivo de la EA.

	n	Alelos del gen <i>APO-E</i>		
		$\epsilon 2$ n (%)	$\epsilon 3$ n (%)	$\epsilon 4$ n (%)
Femenino	64	3 (4.7)	59.5 (92.9)	5.5 (8.6)
Masculino	36	1 (2.7)	28.5 (79.2)	2.5 (6.9)
Total	100	4	88	8

Fuente: Base de datos
Elaborado por: Andrés Sarmiento

GRÁFICA 4.5 Frecuencias alélicas del polimorfismo del gen *APO-E*.



Fuente: Base de datos
Elaborado por: Andrés Sarmiento

Para relacionar las discapacidades presentadas por estos pacientes, el promedio de los años de estudio y del nivel de colesterol total sanguíneo con la presencia del alelo $\epsilon 4$, se determinaron las frecuencias de cada una de las discapacidades y el estadístico respectivo para los últimos, los mismos que se resumen en la TABLA 4.13.

TABLA 4.13 Frecuencias de discapacidades y promedio de concentración de colesterol sanguíneo y años de educación de acuerdo al alelo presente en el gen *APO-E* en pacientes con EA.

	N	Discapacidad mental	Discapacidad física	Discapacidad sensorial	Nivel de educación	Conc. de colesterol total sanguíneo
		n (%)	n (%)	n (%)	Media (años)	Media (mg/dl)
TOTAL	100					
$\epsilon 2/\epsilon 2$	0	-	-	-	-	-
$\epsilon 2/\epsilon 3$	0	-	-	-	-	-
$\epsilon 3/\epsilon 3$	84	68 (80,9)	35 (41,6)	23 (27,3)	7,6	206
SUBTOTAL	84	68 (80,9)	35 (41,6)	23 (27,3)	7,6	206
$\epsilon 2/\epsilon 4$	7	7 (100)	4 (57,1)	1 (14,2)	4,6	234
$\epsilon 3/\epsilon 4$	9	9 (100)	5 (55,5)	4 (44,4)	6,3	228
$\epsilon 4/\epsilon 4$	0	-	-	-	-	-
SUBTOTAL	16	16 (100)	9 (56,2)	5 (31,2)	5,4	231

Fuente: Base de datos
Elaborado por: Andrés Sarmiento

De acuerdo a los datos obtenidos, de los 16 pacientes que presentaron el alelo $\epsilon 4$, 5 tenían discapacidad sensorial, 9 discapacidad física y todos discapacidad mental y al comparar los porcentajes de estas discapacidades por grupos, es decir aquellos pacientes que presentaron el alelo $\epsilon 3$ y los que presentaron el alelo $\epsilon 4$, los valores son mayores para el último grupo; además presentan en promedio menos años de educación y un nivel de colesterol promedio superior, desórdenes y características que acompañan a este desorden neurológico, descritas en la literatura médica.

DISCUSIÓN

Con el aumento de la esperanza de vida y el desarrollo de herramientas en el área de la medicina, el número de casos de pacientes con enfermedades neurodegenerativas ha ido en aumento, enfatizando a la enfermedad de Alzheimer como la patología más frecuente dentro de este grupo de trastornos. Debido a que el deterioro neuronal precede durante varios años a la presentación de signos y síntomas típicos de la enfermedad y que el diagnóstico definitivo solo se lo realiza a través de la realización de una autopsia, se siguen estudiando de manera continua métodos para establecer un diagnóstico aún más certero y temprano para dicha patología. En la actualidad se realizan exámenes clínicos, psicológicos y de imagen para corroborar la existencia de este trastorno, sin embargo, los exámenes de tipo genético molecular se han constituido en una herramienta clave al momento de esclarecer una probabilidad mucho mayor de determinar un diagnóstico veraz para la enfermedad de Alzheimer.

Dentro de los criterios diagnósticos para la EA se encuentra el estudio de la Apolipoproteína E, que mediante la realización de diversas investigaciones, ha demostrado incrementar de gran manera el nivel de certeza en cuanto a su diagnóstico, por cuanto se lo considera el mayor factor de riesgo a nivel genético para la EA tanto familiar como de inicio tardío en diferentes poblaciones a nivel mundial. La Apolipoproteína E en altas concentraciones interviene en la destrucción directa de las células neuronales y además produce altos niveles de toxicidad debido a su función de

modular los depósitos amiloides del cerebro. (Aceves, 2006; Custodio, 2008; Marca, 2011; Singh, 2006).

En el presente estudio se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas del gen de la Apolipoproteína E en 100 individuos con diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer atendidos en instituciones de salud de la ciudad de Quito, de edades comprendidas entre 55 y 90 años de edad; asimismo, se estandarizó una técnica molecular mediante PCR convencional y corte enzimático para la detección y análisis de sus polimorfismos genéticos. La recolección de información fue realizada por el investigador al igual que los procedimientos estandarizados del laboratorio, los mismos que fueron comparados con estudios de poblaciones de Latinoamérica y Europa, y que además cada una de las muestras fueron codificadas para su procesamiento para total confidencialidad de los participantes.

Se encontró una razón de mujeres a varones de 2.2, resultado similar al descrito en la bibliografía de 2 a 1 en la relación de mujeres afectadas por la enfermedad con respecto a los varones; esta razón puede ser justificada por el aumento en la expectativa de vida de las personas del sexo femenino frente al masculino por lo que tienen más susceptibilidad a padecer este tipo de trastornos degenerativos. (Aceves, 2006; Marca, 2011; Paz y Miño, 2010; Singh, 2006).

Respecto a la distribución de los genotipos en la población estudiada, el $\epsilon 3/\epsilon 3$ fue el más frecuente, seguido de los genotipos $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ y $\epsilon 2/\epsilon 3$ respectivamente, sin embargo no se encontraron pacientes homocigotos con los genotipos $\epsilon 2/\epsilon 2$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$. Estos resultados concuerdan con la tendencia observada para la distribución de los genotipos Apo-E a nivel mundial, es decir: $\epsilon 3/\epsilon 3 > \epsilon 3/\epsilon 4 > \epsilon 2/\epsilon 3$. (Aceves, 2006; Marca, 2011; Paz y Miño, 2010; Singh, 2006).

Con respecto a las distribuciones alélicas, el alelo $\epsilon 3$ fue el más frecuente en la población estudiada (0.88 %), siendo una de las frecuencias más altas en el mundo y otorgando una distribución normal; el alelo $\epsilon 2$ es el menos frecuente (0.04 %), dato que coincide con estudios realizados en poblaciones caucásicas, hispánicas, afroamericanas y mestizas, (Gamboa, 2000; Gilliland, 2004; Glare, 2002; Marca, 2011; Paz y Miño, 2010); el alelo $\epsilon 4$ confirió una frecuencia de 0.08 %, muy similar con respecto a las reportadas en otras regiones del mundo (Custodio, 2008; Paz y Miño, 2010), por lo que el presente trabajo podría servir de preámbulo en la realización de

futuras investigaciones con el fin de determinar la asociación del alelo $\epsilon 4$ con el desarrollo de la EA en pacientes ecuatorianos.

Hasta la fecha el único estudio acerca de la enfermedad de Alzheimer en el Ecuador, publicado por *Paz y Miño* en el año 2010, presenta resultados ligeramente variables con respecto a los obtenidos en la población estudiada, puesto que el autor manifiesta que el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ fue el más frecuente, seguido de los genotipos $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ y $\epsilon 2/\epsilon 4$ respectivamente y con la ausencia del homocigoto $\epsilon 2/\epsilon 2$ (Paz y Miño 2010). La variación se centra en las frecuencias de los genotipos $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$ y $\epsilon 2/\epsilon 4$; sin embargo y de cualquier manera se otorga un nivel bajo de asociación entre el alelo $\epsilon 4$ del gen de la Apolipoproteína E y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer para los dos estudios. Dicha variación puede deberse muy probablemente al tamaño de la muestra utilizada para el presente estudio y por otro lado, el hecho de que fuera un muestreo por conveniencia puede considerarse como no representativo para toda la población quiteña con diagnóstico presuntivo de la EA. Es muy probable que otros factores importantes pudieran influir en los resultados, como las características genéticas, o la variabilidad étnica puesto que los individuos no pertenecían a todas las etnias de nuestro país.

Sin embargo, el gen de la Apolipoproteína E ha sido establecido como factor de riesgo asociado con la enfermedad de Alzheimer en los casos esporádicos de inicio tardío, por lo que su genotipificación se considera clínicamente aplicable en individuos que tienen predisposición a padecer la enfermedad, y aunque la presencia de un solo alelo $\epsilon 4$ del gen *APO-E* es considerado como factor de susceptibilidad para desarrollarla, no es una condición necesaria ni suficiente para padecer la patología, puesto que alrededor del 35 % a 50 % de los enfermos no portan ningún alelo $\epsilon 4$ y alrededor del 25 a 50% de los individuos heterocigotos la desarrollarán; además, los individuos que presentan el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ tienen un riesgo de 3-4 veces mayor de desarrollar la EA, resultados similares reportados por estudios realizados en poblaciones caucásicas hispánicas y africanas. (Aceves, 2006; Marca, 2011; Paz y Miño, 2010; Singh, 2006).

La genotipificación del gen de la Apolipoproteína E permite evaluar el riesgo de la EA de manera certera y precoz, en la que el alelo $\epsilon 4$ de dicho gen se expresa mayormente en casos de EA de inicio tardío y de forma esporádica, por lo que también nos ayudaría en gran manera a analizar a los familiares de los pacientes que padezcan este trastorno, para que aun cuando no muestren síntoma alguno, puedan ser

detectados a tiempo si padecen la EA o a su vez corroborar resultados en caso de que se trate de otra enfermedad de tipo neurodegenerativa.

La presencia del alelo $\epsilon 4$ fue más frecuente en el sexo femenino y en la edad comprendida entre 60 y 85 años de edad, datos que se coinciden con los descritos en la bibliografía, la misma que indica que en este rango de edad se produce la degeneración neuronal y formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares, y que su nivel de daño celular empieza a disminuir después de los 90 años, lo que demuestra que la edad es considerada también un factor de riesgo de gran importancia para el desarrollo de la EA. (Aceves, 2006; Marca, 2011; Paz y Miño, 2010; Singh, 2006).

El alelo $\epsilon 4$ del gen de la Apolipoproteína E también está relacionado con niveles altos de colesterol y betalipoproteínas, asociándose de esta manera con un riesgo de presentar patologías de tipo cardiovascular. (Aceves, 2006; Marca, 2011; Paz y Miño, 2010; Singh, 2006). A pesar de que el alelo $\epsilon 2$ del gen de la Apolipoproteína E fue el menos frecuente (0.04 %), se considera que brinda protección para la EA según investigaciones descritas a nivel mundial, sin embargo, el estudio realizado en nuestro país por *Paz y Miño, 2010*, manifiesta que el alelo $\epsilon 2$ no tiene mayor relevancia en cuanto a protección contra la enfermedad, lo que podría justificarse debido a que en países sudamericanos y en Latinoamérica en general la frecuencia de este alelo es muy baja y que además la predisposición genética para este alelo, así como la raza más frecuente es la caucásica y específicamente en la población a nivel de Europa y Estados Unidos. (Aceves, 2006; Marca, 2011; Paz y Miño, 2010; Singh, 2006).

El gen *APO-E* ha sido estudiado en muchas poblaciones a nivel mundial, pero muy poco en nuestro país, por lo que el presente estudio es una de las primeras propuestas en el Ecuador que busca asociar el polimorfismo del gen de la Apolipoproteína E con la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios en otras regiones ecuatorianas en las que de igual manera se analicen los polimorfismos del gen de la Apolipoproteína E que ayuden a sustentar los resultados obtenidos por cuanto en nuestro medio los estudios son aún insuficientes como para tener un cuadro actualizado en esta área del conocimiento.

CONCLUSIONES

- ✓ Se detectaron 16 pacientes heterocigotos para el alelo $\epsilon 4$ del gen de la Apolipoproteína E.
- ✓ La edad de los pacientes que presentaron el alelo $\epsilon 4$ estuvo comprendida entre 60 y 80 años, predominando en el sexo femenino (11 mujeres y 5 varones), similar a los datos obtenidos en otros estudios en los que el género y la edad son considerados factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en su variante tardía.
- ✓ La revisión del historial clínico permitió evidenciar que los pacientes que manifiestan el alelo $\epsilon 4$ del gen de la Apolipoproteína E presentan discapacidad mental, física y sensorial, todas estas relacionadas con el desorden neurológico y que apoyan al diagnóstico clínico, sin embargo la realización de pruebas genéticas y moleculares le otorgarán mayor evidencia diagnóstica en estos trastornos neurodegenerativos de difícil diferenciación.

- ✓ Se estandarizó la técnica de PCR convencional para la detección de polimorfismos del gen de la Apolipoproteína-E mediante la aplicación de un estricto control de calidad en el desarrollo de la investigación y tomando en cuenta parámetros imprescindibles como el uso de controles positivos y negativos en cada amplificación realizada, el empleo de un gen control (Beta actina) para mayor confiabilidad de los resultados, todas las precauciones para evitar la contaminación y las inespecificidades en las etapas de amplificación y digestión enzimática, y la adaptación de la técnica a las condiciones de trabajo de laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, lo que permitirá que se realicen otros estudios en la búsqueda de genes involucrados en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, al haber logrado obtener un protocolo de trabajo válido.

- ✓ Las frecuencias alélicas determinadas en el gen de la Apolipoproteína E manifiestan que el alelo $\epsilon 3$ fue el más frecuente representando un 88 %, seguido del alelo $\epsilon 4$ (8 %) y finalmente el alelo $\epsilon 2$ (4 %) en la muestra estudiada.

- ✓ Las frecuencias genotípicas determinadas en el gen de la Apolipoproteína E muestran que el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ fue el más frecuente, representando un 83 %, seguido del genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ con un 9 %, el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 4$ con un 7 %, y finalmente el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ correspondiente al 1 %.

- ✓ No se detectaron individuos homocigotos portadores de los genotipos $\epsilon 4/\epsilon 4$ y $\epsilon 2/\epsilon 2$ en la muestra analizada.

- ✓ Si bien el alelo $\epsilon 4$ del gen de la Apolipoproteína E es considerado un factor de susceptibilidad que incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en su variante tardía, muchos pacientes homocigotos y heterocigotos presentan la patología sin tener ningún alelo de tipo $\epsilon 4$, como podría ocurrir en la muestra de pacientes con diagnóstico presuntivo de EA estudiada, lo que sugiere que otros factores genéticos y ambientales probablemente estén implicados en el desarrollo de la EA.

- ✓ El éxito del procesamiento de las muestras dependerá en gran parte de los procedimientos llevados a cabo por personal capacitado, puesto que, aunque no se requieren equipos sofisticados, se debe tener precaución en la manipulación, preparación y conservación de muestras y reactivos; asimismo, las técnicas moleculares conllevan procedimientos relativamente largos, utilización de material específico, obtención de resultados después de varias horas y un análisis costoso para cierto tipo de pacientes, situaciones que deben tomarse muy en cuenta a la hora de desarrollar estos métodos y proponerlos para la práctica como ayuda al diagnóstico temprano de trastornos neurodegenerativos.

RECOMENDACIONES

Después de haber culminado el presente estudio se recomienda:

- ✓ Designar un área específica de trabajo para el procesamiento de muestras (ADN) y establecer condiciones óptimas de almacenamiento y conservación para este tipo de material biológico, de esta manera se evitará en gran parte cualquier tipo de contaminación con otros materiales y reactivos de laboratorio, garantizando aún más la confiabilidad a la hora de la obtención de los resultados.
- ✓ Establecer un programa de apoyo a pacientes con EA y a sus familiares tanto con soporte médico, económico o psicológico, ya que el Ministerio de Salud del Ecuador dentro de su programa “RED DE PROTECCIÓN SOLIDARIA” apoya a pacientes con enfermedades catastróficas como las leucemias, insuficiencia renal, VIH (SIDA) y cáncer en general, sin embargo, aún no se ha implementado un sistema de ayuda para enfermedades de tipo neurodegenerativas.
- ✓ Extender más investigaciones acerca de otros genes que predisponen a padecer la enfermedad de Alzheimer en la población ecuatoriana, para de esta manera robustecer la etiología de la enfermedad y brindar una mayor certeza en el diagnóstico de la patología en los pacientes adultos mayores del Ecuador.

- ✓ La determinación del genotipo *APO-E* en pacientes con diagnóstico presuntivo de padecer la EA solo puede ser establecida como un marcador de apoyo al diagnóstico, más no como test diagnóstico confirmatorio, debido a que la presencia del alelo $\epsilon 4$ no establece por si solo un determinante para desarrollar la EA, ni la ausencia de este no descarta el diagnóstico de la EA. La presencia del alelo $\epsilon 4$ en un individuo con demencia similar a la EA muy probablemente la padecerá, sin embargo, se recomienda que a más de la genotipificación se realicen exámenes complementarios para definir con mayor certeza una mayor probabilidad de tener la enfermedad.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1:

FORMULARIO DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE PACIENTES

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRE DEL PACIENTE:

CÓDIGO:

EDAD:

GÉNERO:

ETNICIDAD:

NIVEL DE EDUCACIÓN:

EMPLEO:

ESTADO CIVIL:

LUGAR DE PROCEDENCIA:

ANTECEDENTES DE LA ENFERMEDAD

INDIVIDUO CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA EA:

SI

NO

INDIVIDUO TIENE FAMILIARES DE HASTA 3ER GRADO DE CONSANGUINIDAD QUE TENGAN ANTECEDENTES DE PADECER LA EA:

SI

NO

HISTORIA MÉDICA DONDE INDIQUE REALIZACIÓN DE EXÁMENES CLÍNICOS O DE IMAGEN:

SI

NO

EL INVIDIDUO PRESENTA O PADECE DE ALGÚN OTRO TIPO DE ENFERMEDAD:

SI

NO

DETALLAR EL TIPO DE ENFERMEDAD (SI LA PADECE):

DETALLE DE LOS EXÁMENES REALIZADOS ANTERIORMENTE:

EVALUACIÓN MENTAL:

OBSERVACIONES:

AS.

8.2 ANEXO 2:

FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO

FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a participar en la investigación “*GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, ATENDIDOS EN INSTITUCIONES GERIÁTRICAS DE LA CIUDAD DE QUITO, DE MAYO A DICIEMBRE DEL 2012, POR PCR CONVENCIONAL*”.

Respecto a la extracción de la muestra he sido informado de que los riesgos son nulos y que únicamente se puede llegar a sentir un dolor mínimo al momento del pinchazo. Sé también que posiblemente no haya beneficios de primer orden para mi persona y que no habrá ningún tipo de estímulo a nivel económico. Se me ha proporcionado la información necesaria para total conocimiento del proyecto y también se me ha facilitado el contacto de la(s) persona(s) responsable(s) en caso de tener alguna duda adicional o inconveniente acerca de la investigación.

He leído la información proporcionada (o me ha sido leída). He tenido la oportunidad de cuestionar todo lo que al proyecto respecta y todas las preguntas me han sido contestadas satisfactoriamente. He decidido participar de manera voluntaria en esta investigación y tengo entendido que estoy en todo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que afecte mi cuidado médico.

Nombre del participante:

Firma del participante:

Fecha: Día/mes/año.

En caso de ser analfabeto:

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para total conocimiento del participante, y el individuo ha tenido la oportunidad de realizar todas las preguntas pertinentes. Confirmando que el individuo ha decidido participar de forma libre.

Nombre del testigo:

Huella dactilar del participante:

Firma del testigo:

Fecha: Día/mes/año.

Ha sido proporcionada una copia de este documento de consentimiento informado al participante y/o a su representante.

Iniciales del investigador asistente: AS.

BIBLIOGRAFÍA

- Aceves, D. et. al. (2006). Heterogeneity of Apolipoprotein E polymorphism in different Mexican populations. *Ann Hum. Biol*; 78:65-75. Obtenido de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2013/er132e.pdf>.
- Artiga, M. et. al. (2004). Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol. Genet*; 7-92. Obtenido de: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/7/12/1887.full>.
- Bartzokis, G. et. al. (2006). Apolipoprotein E genotype and age-related myelin breakdown in healthy individuals. *Archives of General Psychiatry*; 63:63-72. Obtenido de: <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fjamanetwork.com%2Fdata%2FJournals%2FPSYCH%2F5237%2FYOA50216.pdf&ei=OMUmU7aZLM3pkAfHhIGwCw&usq=AFQjCNEy6GfvjUZTV3CmHaGd5yw9ZqhDbg&bvm=bv.62922401,d.eW0>.
- Baum, L. et. al. (2001). Apolipoprotein E isoforms in Alzheimer's disease pathology and etiology. *Microsc. Res Tech*; Pág. 50:278-81. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199511093331902>.
- Bertram, L. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the Implications of systematic meta-analyses; *Nat Rev*. 9:768-78. Obtenido de: <http://www.nature.com/nrn/journal/v9/n10/abs/nrn2494.html>.
- Bertram, L. (2009). Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*; 18:137-45. Obtenido de: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/18/R2/R137.full>.
- Beyer, K. (2002). Caracterización genética de la enfermedad de Alzheimer, estudio poblacional, Pág. 19. Obtenido de: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/4228/kb1de1.pdf?sequence=1>.
- Bick, K. (1994). The early story of Alzheimer Disease. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*. Obtenido de: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-92272003041200002&script=sci_arttext.
- Bossy, E. (2004). Apo-E genotyping and Alzheimer's disease. *Lancet*. 347:1184-5. Obtenido de: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-92272003041200002&script=sci_arttext.
- Breitner, J. (2006). Apo-E genotyping and Alzheimer's disease. *Lancet*. 347:1184-5. Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2690397/>.

- Bullido, M. (2008). A polymorphism in the regulatory region of APO-E associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet*; 18:69-71. Obtenido de: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/7/12/1887.full>.
- Burns, A. (2002). Alzheimer's disease. *Lancet*; 360: 163-165. Obtenido de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2013/er132e.pdf>.
- Campion, D. (2006). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity and mutation spectrum. *Hum Genet*. 65:664-70. Obtenido de: [https://www.cell.com/AJHG/abstract/S0002-9297\(07\)62317-9](https://www.cell.com/AJHG/abstract/S0002-9297(07)62317-9).
- Castro, A. (2013). La enfermedad de Alzheimer: bases moleculares y aproximaciones terapéuticas. Obtenido de: <http://www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/intereshtml/alzheimer/alzheimer.htm>.
- Chalmers, K. (2003). Apoe-e4 influences the pathological phenotype of Alzheimer's disease by favouring cerebro-vascular over parenchymal accumulation of Ap-protein. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 29:231-8. Obtenido de: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0020228.html>.
- Chung, H. (2003). A newly identified polymorphism in the apolipoprotein E enhancer gene region is associated with Alzheimer's disease and strongly with the epsilon 4 allele. *Neurology*. 47:196-201. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011613>.
- Consejo de colegios oficiales de farmacéuticos. (2012). La enfermedad de Alzheimer, *Punto farmacológico No 69*. Obtenido de: <http://www.ncbi.org/doi/full/05.1056/nejmoa>.
- Corrada, M. et. al. (2010). Demencia incidente continues to increase with age in the oldest old: the 90 study. *Ann Neurol*; 67:114-21. Obtenido de: http://www.fundaciondelcerebro.es/docs/imp_social_alzheimer.pdf.
- Cruts, M. et. al. (2004). Estimation of the genetics contribution of presenilin 1 and 2 mutations in a population based study of presenil Alzheimer disease. *Hum Mol Genet*; 71:43-51. Obtenido de: http://www.postersessiononline.com/312191188_es/congresos/61rasen/aula/poster_29777.pdf.
- Cuesta, P. et. al. (2009). Prevalence of predementia and major dementia subtypes in Spanish populations: a reanalysis of dementia prevalence surveys, *BMC Neurol*; 19:9-55. Obtenido de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102555832012000400009.

- Custodio, N. et. al. (2008). Prevalencia de demencia en una población urbana de Lima-Perú. *An Fac. med:* 69:233-238. Obtenido de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1110>.
- D' Arrigo, M. et. al. (2006). Frecuencia alélica de Apolipoproteína E en una población aborigen. *Universidad Nacional de Rosario*. Obtenido de: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S181295282006000100007&script=sci_arttext.
- Eisendrath, S. (2006). Trastornos psiquiátricos. Delirio, demencia y otros trastornos cognitivos. *Diagnóstico clínico y tratamiento*. 41ª edición. México: 955-956. Obtenido de: http://med.unne.edu.ar/revista/revista175/3_175.pdf.
- Ertekin, T. (2007). Genetics of Alzheimer's disease: a centennial review. *Neuro/ Clin*. 25:611-77. Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17659183>.
- Fariñas, F. et. al. (2002). Enfermedad de Alzheimer: deterioro cognitivo y funcional asociado a polimorfismos de APOE y A2M. *Publicado en Rev Esp Geriatr Gerontol;* 2(37); 111-9. Obtenido de: <http://zl.elsevier.es/es/revista/revistaespanolageriatriagerontologia124/enfermedad-alzheimer-deterioro-cognitivo-funcional-asociado-polimorfismos-13028410-originales-2002>.
- Farrer, L. et. al. (2002). Statement on use of apolipoprotein E testing for Alzheimer disease. *Consensus statement*. *JAMA*. 274:1627-9. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011613>.
- Fratiglioni, L. et. al. (2005). Incidence major subtypes of Alzheimer in Europe: A collaborative study. *Neurology;* 54:10-5. Obtenido de: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/prevalence.pdf>.
- Gamboa, R. et. al. (2000). Apolipoprotein E polymorphism in the indian an mestizo population of Mexico. *Hum. Biol;* 72:975-81. Obtenido de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1110>.
- Gilliland, G. et. al. (1990). Comparative PCR for quantitation of mRNA. PCR protocols a guide to methods and applications. *Hum Biol:* 60-9. Obtenido de: <http://www.pnas.org/content/87/7/2725.short>.
- Glare, E. et. al. (2002). β -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*. 57:765-770. Obtenido de: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/prevalence.pdf>.
- González, C. (2007). Últimos avances en el diagnóstico molecular y por imagen de la enfermedad de Alzheimer: 24-31. Obtenido de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2009.00962.x/references>.

- Graeber, M. (1999). No Man Alone: The Rediscovery of Alois Alzheimer's Original Cases. *Brain Pathology*; 237: 237-240. Obtenido de: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/prevalence.pdf>.
- Grunenthal. (2011). *Todoalzheimer.com*. Obtenido de: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/prevalence.pdf>.
- Helisalmi, S. (2002). Promoter polymorphism (-491A/T) in the APOEε gene of Finnish Alzheimer's disease patients and control individuals. *Neurol.* 246:821-4. Obtenido de: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/incidence.pdf>.
- Holmes, C. (2002). Genotype and phenotype in Alzheimer's disease. *Br. J Psychiatry.* 180:131-4. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011613>.
- Howard, K. (2009). Advances in genetic testing for Alzheimer's disease. *Rev Neurol Dis*; 6:26-32. Obtenido de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1110>.
- Invitrogen. (2012). *Life Technologies* Obtenido de: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K182302>.
- Invitrogen. (2010). *Life Technologies*. Obtenido de: http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell_tissue_analysis/Qubit-all-file-types.Par.0519.File.dat/Qubit-2-Fluorometer-User-Manual.pdf.
- Invitrogen. (2010). Qubit™ dsDNA HS Assay Kits. Obtenido de: http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/cell_tissue_analysis/Qubit-all-file-types.Par.0519.File.dat/Qubit-2-Fluorometer-User-Manual.pdf.
- Invitrogen. (2010). Qubit™ *HhaI*, Concentración de enzimas de restricción, Obtenido de: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/25212010.pdf>.
- Invitrogen. (2010). Qubit™ *HhaI*, Concentración de enzimas de restricción. Obtenido de: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/NewslettersandJournals/BioProbes-Journal-ofCellBiologyApplications/BioProbesIssues2012/bioprob68-november-2012/myqubit-qubitfluorometer.reg.us.html>.
- James, B. (2010). Increasing incidence of dementia in the oldest people: evidence and implications. *Alzheimers Res Ther.* 2:2-9. Obtenido de: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/prevalence.pdf>.
- Kamboh, M. (2004). Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet.* 68:381-404. Obtenido de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2009.00962.x/references>.

- Kawas, C. et. al. (2005). Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease. The Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology*. 54:2072-7. Obtenido de: <http://www.pnas.org/content/87/7/2725.hdct>.
- Kettl, P. (2007). Helping families with end-of-life care in Alzheimer's disease. *Clinic Psychiatry*. Mar, 68:428-9. Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17388717>.
- Kircher, T. et. al. (1996). Origin of Alois Alzheimer's Interest in Neurohistology. *Revista chilena de neuropsiquiatría*, 153: 1369-1370. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011613>.
- Koenig, S. (2006). Genetic testing and Alzheimer disease: recommendations of the Stanford Program in Genomics, Ethics and Society. *Genet Test*. 3:3-12. Obtenido de: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-92272003041200002&script=sci_arttext.
- Kukutl, W. (2002). Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Arch Neurol*; 59:1737-46. Obtenido de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1110>.
- Lambert, J. (2009). Genome wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 41:1094-9. Obtenido de: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/prevalence.pdf>.
- Lippa, C. (2002). Apolipoprotein E-E2 and Alzheimer's disease: genotype influences pathologic phenotype. *Neurology*. 48:515-9. Obtenido de: <http://www.pnas.org/content/87/7/2725.short>.
- Maes, O. (2009). Implications for Alzheimer disease and other human CNS disorders. *Curr Genomics*. 10:154-68. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011613>.
- Marca, V. et. al. (2011), *Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en una población peruana, rev peru med exp salud pública*; 28(4):589-94. Obtenido de: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172646342011000400003&script=sci_arttext.
- Marca, V. et. al. (2011). Polimorfismo genético de la Apolipoproteína E en una población peruana. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*. 28:589-94. Obtenido de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a03v28n4>.
- McConnell, L. (2003). Evaluation of genetic tests: ApoE genotyping for the diagnosis of Alzheimer disease. *Genet Test*. 3:47-53. Obtenido de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2009.00962.x/references>.

- Myers, R. et. al. (1996). Apolipoprotein E E4 associated with dementia in a population-based study. *The Framingham Study: Neurology*; 46:673-7. Obtenido de: <https://www.neurology.org/content/46/3/673.extract>.
- Myers, R. (2008). Apolipoprotein E-e4 association with dementia in a population-based study. *Neurology*. 46:673-7. Obtenido de: <http://www.pnas.org/content/87/7/2725.short>.
- Nih. (2011). Alzheimer's disease genetics. *Hum Ann*; 1-11. Obtenido de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1110>.
- Navarro, E. (2010). Alzheimer, "Un desafío compartido", Enero 11. Obtenido de: <https://alzheimerundesafiocompartido.wordpress.com/author/alzheimerundesafiocompartido/page/3/>.
- Oddo, S. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 24:1063-70. Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306944>.
- Pastor, P. (2004). Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Curr Psych Rep*. 6:125-33. Obtenido de: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/prevalence.pdf>.
- Paz y Miño, C. et. al. (2010). Genetic Polymorphisms in Apolipoprotein E and Glutathione Peroxidase 1 Genes in the Ecuadorian Population Affected with Alzheimer's Disease; 340:373-377. Obtenido de: <http://www.mdlinx.com/neurology/print.cfm/3365814/alzheimer-disease>.
- Pedersen, N. (2010). Reaching the limits of genome-wide significance in Alzheimer disease: back to the environment. *JAMA*. 303:1864-5. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011613>.
- Peters, A. (2009). Hypertension, dementia, and antihypertensive treatment: implications for the very elderly. *Curr Hypertens Rep*. 4:277-82. Review. Obtenido de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2009.00962.x/references>.
- Petersen, R. (2006). Predictive value of ApoE genotyping in incipient Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci*. 802:58-69. Obtenido de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1110>.
- Philip, B. (2011). Roles of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease and other neurological disorders, Nih, March. Obtenido de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442210703252>.
- Ray, S. (2007). Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med*. 13:1359-62. Obtenido de: <http://www.pnas.org/content/87/7/2725.short>.

- Relkin, N. (2006). The National Institute on Aging/Alzheimer's Association Recommendations on the Application of Apolipoprotein E Genotyping to Alzheimer's Disease. *Ann NY Acad Sci.* 802:149-71. Obtenido de: <http://www.nature.com/gim/journal/v10/n4/full/gim200836a.html>.
- Rocchi, A. (2007). Susceptibility genes for Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 30:1-24. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011613>.
- Roks, G. (2005). Effect of the APOE-491A/T promoter polymorphism on apolipoprotein E levels and risk of Alzheimer disease: *Am. J-Med Genet.* 114:570-3. Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10530514>.
- Roses, A. (1996). Apolipoprotein E in neurology. *Curr Neurol;* 265:70-45. Obtenido de: http://brishur.com/medline/mem_query?r=2&mem=1263&pg=115.
- Rovelet, A. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet.* 38:24-6. Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16369530>.
- Saunders, A. (2005). Association of apolipoprotein E allele with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology.* 43:1467-72. Obtenido de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2009.00962.x/references>.
- Seshadri, S. (2003). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *Engl. J. Med.* 346:476-83. Obtenido de: <http://www.alz.co.uk/adi/pdf/prevalence.pdf>.
- Shen, J. (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer disease: evidence for a loss of function pathogenic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:403-9. Obtenido de: <http://www.pnas.org/content/87/7/2725.short>.
- Small, S. (2008). Linking Ap. and tau in late-onset Alzheimer's disease: A dual pathway hypothesis. *Neuron.* 60:534-42. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011613>.
- Tandon, A. (2004). Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of p-amyloid and presenilins. *Curr Opin Neurol.* 13:377-84. Obtenido de: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1110>.
- Tanzi, R. (2005). Apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease. *Lancet.* 347:1091-5. Obtenido de: <http://www.revistaalzheimer.com/PDF/0215.pdf>.
- Theuns, J. (2005). Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression. *Hum Mol Genet.* 9:325-31. Obtenido de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2009.00962.x/references>.

- Thome, J. (2006). Polymorphisms of the human apolipoprotein E promoter and bleomycin hydrolase gene: risk factors for Alzheimer's dementia. *Neurosci. Lett.* 274:37-40. Obtenido de: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa011613>.
- Van Duijn, A. (2005). Genetic association of the presenilin-1 regulatory region with early-onset Alzheimer's disease in a population-based sample. *Eur. J. Hum. Gene.* 7:801-6. Obtenido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1734889/>.
- Van Gool, W. (2006). The use of apolipoprotein E genotyping as a diagnostic test in suspected Alzheimer's disease. *Ann NY Acad. Sci.* 802:79-91. Obtenido de: <http://publicationslist.org/w.a.vangool>.
- Villacis, B. (2011). Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). Obtenido de: http://www.inec.gob.ec/inec/index.php?option=com_content&view=article&id=360%3Aenelecuadorhay1229089adultosmayores28sesientedesamparado&catid=68%3Aboletines&Itemid=51&lang=es.
- Voet, D. (2007). Fundamentos de Bioquímica. *La vida a nivel molecular. 2da Ed. Pág. 105-107.* Obtenido de: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-92272003041200002&script=sci_arttext.
- Voet, D. (2010). *Fundamentos de Bioquímica.* Obtenido de: http://books.google.com.ec/books?id=FXDiqLK6GmAC&pg=PA105&lpg=PA105&dq=electroforesis+fundamento&source=bl&ots=UqKACoWSH&sig=kWy4d58JIVtH_2nJu8WTLy3pnbQ&hl=es&sa=X&ei=DeyjUbj2L4L68QSG24HgBQ&sqi=2&ved=0CHoQ6AEwDQ#v=onepage&q=electroforesis%20fundamento&f=false.pdf.
- Williamson, J. (2009). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist.* 15:80-6. Obtenido de: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-92272003041200002&script=sci_arttext.