



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

"DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LA APOLIPOPROTEÍNA E (Apo E) EN INDIVIDUOS CON PROBABLE DEMENCIA TIPO ALZHEIMER"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

NANCY CRUZ GONZÁLEZ

ASESORES:

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

TTE. Q. B. M. EN C. JESÚS GABRIEL SILVA ESCOBEDO.

TTE. Q. B. PASCUAL FRANCISCO LUCIO MONTER.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Determinación del genotipo de la Apolipoproteína E (ApoE)
en individuos con probable demencia tipo Alzheimer".

que presenta la pasante: Nancy Cruz González
con número de cuenta: 09854308-1 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 4 de Febrero de 2009

PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
VOCAL	<u>OFB. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
SECRETARIO	<u>OFB. Gabriela Escalante Reynoso</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Verónica Castro Bear</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Maritere Domínguez Rojas</u>	



Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Laboratorio Multidisciplinario de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Estuvo a cargo de:

Director del Proyecto:

Gral. Div. M. C. Ret. Jorge Islas Marroquín.

Subdirector de Investigación:

Tte. Cor. M. C. Ramón Arturo Valdés Espinosa.

Investigadores y Asesores:

Tte. Q. B. M. En C. Jesús Gabriel Silva Escobedo.

Tte. Q. B. Pascual Francisco Lucio Monter.

AGRADECIMIENTOS.

Le debo tanto a mucha gente porque he sido muy afortunada en contar con personas que me han ayudado, gracias a ellos he podido realizar y culminar este trabajo. Gracias...

Dios:

Por la vida que me has prestado y la oportunidad de disfrutarla a diario haciendo que cada día sea increíble.

Padres:

Por todos los esfuerzos y sacrificios que siempre hacen para que sus hijos sean mejores, por su apoyo, amor, comprensión, paciencia, cariño y porque pase lo que pase siempre están conmigo, pero sobre todo por enseñarme que con esfuerzo y esmero puedo alcanzar mis metas, los amo muchísimo.

Abuelos:

Por su amor, cariño y porque a pesar de las adversidades impulsaron a sus hijos a salir adelante y gracias a su esfuerzo hoy esto es posible, los amo.

Hermano:

Gracias por ser mi amigo, por cuidarme, consentirme, por los pleitos y alegrías, porque siempre me apoyas y cuando cometo disparates me haces reflexionar y porque parte de esto es tuyo, te amo.

Feli:

Porque más que mi tía has sido como una segunda madre, por todo tu apoyo, tus consejos, tu tiempo y todo el amor que me das, porque siempre me alientas a ser una mejor persona y prepararme más, te admiro y te amo mucho.

Lulú:

Por tu confianza, amor, cariño y apoyo, pero sobre todo por enseñarme que a pesar de las adversidades con actitud y esfuerzo se supera todo.

Gina:

Por escucharme, consentirme, ser mi cómplice y quererme tanto, sin tu apoyo no podría hacer muchas cosas.

Tíos Angélica y Juan José:

Por todo el cariño y apoyo que siempre me han brindado, gracias por tomarse el tiempo de ayudarme espero contar con ustedes siempre, los quiero.

Carlos:

Por impulsarme a terminar esta meta y apoyarme en ello, por ser mí novio, mi amigo, mi confidente y por todo el amor que me das, te amo.

Betsa, Iztshel, Alma, Diana, Miriam, Fernando, Cesáreo, Adolfo, Lilian y Enrique.

La Universidad no hubiera sido tan genial como lo fue gracias a ustedes, mil gracias por las alegrías, por todo lo que me compartieron y por el apoyo incondicional que me dieron para lograr alcanzar mi meta, amigos espero contar con ustedes siempre.

Eric, Leticia, Eliuth, Dulce, Alfredo, Edgar, Víctor, Joaquín y Alejandro.

Por ser mis compañeros y amigos, gracias por enseñarme a trabajar en equipo y hacer de ello una experiencia maravillosa, por los conocimientos compartidos, pero sobre todo mil gracias por ayudarme a crecer en mi vida profesional, son geniales.

Dra. Sandra

Por ser mi profesora y aceptar dirigir este trabajo, por su paciencia, sus consejos y ayuda, sin usted esto no hubiera sido posible, en verdad muchas gracias.

M. en C. Gabriel

Por dejarme trabajar con usted y facilitarme todo lo necesario para que este trabajo se llevara a cabo, por su paciencia, consejos, ayuda y por los conocimientos compartidos.

Biólogo Pascual

Por enseñarme y apoyarme durante la experimentación, gracias a usted aprendí que no todos los fracasos son malos y que lo importante es aprender de ellos.

A la Torre de Investigación de la Escuela Médico Militar.

Porque sus directivos y personal en general me brindaron no solo la oportunidad de realizar mi tesis, sino que compartieron conmigo sus conocimientos y toda su experiencia.

UNAM FESC-1.

No tengo palabras para agradecer la oportunidad de estudiar, fue mi casa, pude aprender muchas cosas, conocí y tuve a excelentes maestros, conocí a mis mejores amigos, hiciste de mi la profesionista que soy hoy, en verdad fue una de las mejores experiencias en la vida y porque siempre será la máxima casa de estudios. GOYA GOYA CACHUN CACHUN RARA CACHUN CACHUN RARA GOYA iiiUNIVERSIDAD!!!

INDICE GENERAL

Abreviaturas	<i>i</i>
Lista de Figuras	<i>ii</i>
Lista de Tablas	<i>iii</i>
Resumen	<i>iiii</i>
1. Introducción	1
1.1. Anatomía del cerebro	3
1.2. Metabolismo de los lípidos	7
1.3. Demencia	12
1.3.1. Enfermedad de Alzheimer	12
1.4. Neuropatología	14
1.5. Activación microglial y macrofágica	18
1.6. Genética de la enfermedad	19
1.6.1. Proteína precursora amiloide	19
1.6.2. Presinilina 1 y 2	23
1.6.3. Apolipoproteína E	25
2. Justificación	30
3. Hipótesis y Objetivos	31
4. Metodología	32
5. Diagrama de flujo	36
6. Resultados	37
6.1. Estadística descriptiva	43
6.2. Prueba de Fisher	43
6.3. Proporción Odds	44
6.4. ANOVA	45
7. Discusión	47
8. Conclusiones	51
9. Bibliografía	52

ABREVIATURAS.

a.a	Aminoácido
β A	Péptido β -amiloide
CML	Células de músculo liso
EA	Enfermedad de Alzheimer
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APOE	Apolipoproteína E
PP β A	Proteína Precursora del β -amiloide
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DNF	Degeneraciones neurofibrilares
FCE	Fluido Cerebro Espinal
HFA	Historia Familiar con Alzheimer
HCCA	Hemorragia cerebral con amiloidosis
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
KD	Kilodaltones
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
MMSE	Prueba mínima para determinación del estado mental
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PS1	Presenilina-1
PS2	Presenilina-2
ARN	Ácido ribonucléico
ARNm	Ácido ribonucléico mensajero
SNC	Sistema Nervioso Central
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ϵ 2	Alelo épsilon 2 del gen de la APOE
ϵ 3	Alelo épsilon 3 del gen de la APOE
ϵ 4	Alelo épsilon 4 del gen de la APOE

LISTA DE FIGURAS.

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
1	Hemisferios del Cerebro.	3
2	Esquema de la corteza cerebral.	5
3	Esquema de una neurona.	6
4	Las células del encéfalo.	6
5	Lipoproteína plasmática.	9
6	Unión de un quilomicron a la lipoproteína lipasa.	10
7	Rutas de transporte y destino de las lipoproteínas.	11
8	Cerebro de un paciente con EA.	14
9	Cortez coronales de un hemisferio con EA.	14
10	Resonancia Magnética de un Cerebro con EA.	15
11	Placas neuríticas.	16
12	Degeneraciones neurofibrilares.	16
13	Microscopia de una degeneración neurofibrilar.	17
14	Dominio funcional del gen del PPβA.	20
15	Esquema del proceso del PPβA.	22
16	Esquema de una cromátide del cromosoma 21.	23
17	Estructura de los genes de presinilina.	24
18	Gen de la ApoE.	25
19	Hipótesis del mecanismo de ApoE.	29
20	Esquema de una cromátide del cromosoma 19.	28
21	Gel de agarosa al 1%.	37
22	Gel de agarosa al 1%.	37
23	Gel de agarosa al 1%.	37
24	Gel de agarosa al 2.5%.	38
25	Gel de agarosa 1000 al 3%.	39
26	Frecuencias fenotípicas de ApoE.	42
27	Frecuencias alélicas de ApoE.	43

LISTA DE TABLAS.

TABLA	NOMBRE	PÁGINA
1	Propiedades de las principales apoproteínas.	8
2	Apoproteínas.	8
3	Factores de riesgo y protección para la presentación de Alzheimer.	13
4	Mutaciones en el gen PPβA	21
5	Reactivos para la mezcla de PCR.	33
6	Bandas para cada alelo.	34
7	Bandas para cada genotipo.	35
8	Hombres con posible demencia tipo Alzheimer y hombres sanos.	40
9	Mujeres y hombres con posible demencia tipo Alzheimer.	40
10	Mujeres con posible demencia tipo Alzheimer y mujeres sanas.	41
11	Frecuencia genotípica y alélica.	42
12	No. de individuos con presencia o ausencia del alelo ε4.	44
13	Proporción entre el genotipo ε2/ε3 y ε4/ε4.	44
14	Proporción entre el genotipo ε3/ε3 y ε3/ε4.	44
15	Proporción entre el genotipo ε3/ε4 y ε4/ε4.	45
16	Proporción entre mujeres y hombres.	45
17	Frecuencias de cada genotipo.	45

RESUMEN.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es considerada como la principal causa de demencia y la cuarta causa de muerte en países desarrollados. Se define como un padecimiento neurodegenerativo del sistema nervioso central y se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cerebrales superiores (Florence, et al., 2001). Se acepta dos grupos de EA según la edad de inicio del cuadro clínico en forma presenil o temprana y forma senil o tardía; hay que puntualizar que morfológicamente no presentan diferencias y solo se les ha dividido por la edad de inicio de la enfermedad (Enzo E., et. al., 2004).

Se han identificado mutaciones asociadas con la enfermedad de Alzheimer autosómica dominante de inicio temprano en el gen de la proteína precursora del β amiloide (PP β A), el gen de la presenilina 1 (PS1) y el gen de la presenilina 2 (PS2) (Sorbi, et. al., 2001). No se han identificado causas mendelianas en la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Sin embargo, tanto la de inicio tardío familiar como la esporádica se asocian con el alelo ϵ 4 del gen de la apolipoproteína E (APOE), aunque a este respecto existen numerosas controversias, se han desarrollado varios estudios en diferentes poblaciones del mundo, los cuales han permitido conocer que el alelo ϵ 3 tiene una mayor frecuencia que los alelos ϵ 2 y ϵ 4. En muchos estudios se ha encontrado relación entre la presentación del alelo ϵ 4 y la EA, pero en otros no; por lo que se ha propuesto que la ubicación geográfica y el grupo étnico al que pertenezca cada población de estudio, puede definir si el alelo ϵ 4 de APOE tiene relación o no con el desarrollo de la EA en cualquiera de sus formas (Singh, et. al., 2006).

En el presente trabajo se determinó la frecuencia en la que se presentan cada uno de los alelos de APOE en una muestra de 49 pacientes con probable demencia tipo Alzheimer y 43 individuos sanos captados en consulta externa de neurología y geriatría del Hospital Central Militar y la Clínica de Especialidades Médicas. Utilizando la prueba de Mini-Mental se estableció el estado mental y el grado de deterioro cognitivo (si es que se presenta). Se realizaron pruebas de gabinete y para la realización de la genotipificación se trabajó con muestra de sangre total, para realizar la extracción de ADN y mediante PCR se obtuvieron los fragmentos para la genotipificación. Las frecuencias alélicas obtenidas en el total de la muestra fue de 95.65% para el alelo ϵ 3, 20.65% para el alelo ϵ 4 y de 17.4% para el alelo ϵ 2. Aunque no se encontró relación entre la presencia del alelo ϵ 4 y la EA, este podría estar involucrado con la evolución patológica de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

El 4 de noviembre de 1906, Alois Alzheimer en la XXXVII Conferencia de Psiquiatras del Sureste Alemán, en Tübingen, describió por primera vez una forma de demencia que posteriormente, por sugerencia de Emil Kraepelin se conoció como la enfermedad de Alzheimer (www.universomedico.com).

El Dr. Alois Alzheimer describió una alteración física encontrada en el cerebro de una paciente de 51 años que presentaba graves problemas de memoria y al realizar cortes histológicos del cerebro y revisarlos al microscopio observó la existencia de una degeneración de las células nerviosas lo que impide el paso a las señales electroquímicas entre una neurona y otra, provocando el deterioro de funciones intelectuales como la memoria, el pensamiento y el razonamiento, por lo que generalmente también la conducta registra importantes alteraciones (www.salud.gob).

Anteriormente se pensaba que esta alteración era propia de la senectud ya que se observa con mucho más frecuencia en edades avanzadas por lo que se le dio el término de demencia senil, posteriormente se observó que esta demencia se podía presentar en personas jóvenes y de forma progresiva, anatomopatológicamente idéntica, con atrofia cerebral difusa, pero que se presenta bastante tiempo antes del periodo senil, por lo que se le llamó demencia presenil. Esta distinción entre ambos procesos es puramente clínica; anatomopatológicamente tan sólo difieren por el hecho de que las anomalías características tienden a ser más graves y difusas en los casos de inicio temprano que en los que aparecen en la edad senil (Enzo, et. al., 2004). Actualmente se sabe que la razón de esta diferencia es debida a que los pacientes de edades avanzadas pueden llegar a morir antes de que se presenten síntomas aun más agudos (Harrison, et. al., 1979).

La enfermedad de Alzheimer es una forma de demencia caracterizada por la destrucción de neuronas, que conduce a una alteración de los neurotransmisores, en particular de aquellos que se encargan de almacenar información en la memoria, de ahí que tenga un impacto importante particularmente en esta área del pensamiento. En la década de los ochenta a esta enfermedad se le reconoció como un problema mayor de salud pública a nivel mundial. (www.salud.gob).

En la actualidad de los más de 20 millones de casos detectados de Alzheimer en el mundo, dos millones corresponden a México, afirmó Margarita Terán, doctora en sociología por la Universidad de Salamanca, España y profesora titular de la Escuela Nacional de Trabajo Social (ENTS) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), durante el intercambio de experiencia con docentes del Augsburg College, de Estados Unidos. Refirió que la Organización Mundial de la Salud calcula que el Alzheimer afecta entre 17 y 25

millones de personas en el orbe, lo que representa 70% de las enfermedades geriátricas. (La Jornada, martes 26 de junio de 2007).

Es importante considerar que pocas afecciones tienen un impacto tan grande sobre la calidad de vida del enfermo y de su familia como los padecimientos mentales y, en particular, la enfermedad de Alzheimer (www.salud.gob).

La edad avanzada es el principal factor de riesgo para sufrir la EA, aunque una minoría puede presentarla antes de los 60 años. Se ha visto que entre el 2 y 3 % de la población menor de 65 años muestra signos de la enfermedad, mientras que con cada 5 años de envejecimiento, el riesgo casi se duplica, pues aumenta hasta en un 25 y 30% en los mayores de 85 años (Pareja, et. al., 2008; Di Carlo, et. al., 2002). También hay diferencia en el sexo, ya que se aprecia un riesgo mayor de padecer la enfermedad en las mujeres, en particular entre la población mayor de 85 años (Di Carlo, et. al., 2002; Andersen, et. al., 1999).

La prevalencia de la EA en la población depende de factores como la incidencia o cantidad de casos nuevos y la supervivencia de los pacientes ya diagnosticados. Debido a que la incidencia de la EA aumenta con la edad, es de particular importancia incluir en los datos la edad promedio de la población estudiada. En los Estados Unidos, la prevalencia de la EA fue de un 1.6% en el año 2000, tanto en la población general como en la comprendida entre los 65 y 74 años. Se apreció un aumento del 19% en el grupo de los 75 a 84 años de edad (Hebert, et. al., 2003); sin embargo las tasas de prevalencia en las regiones menos desarrolladas del mundo son inferiores (Ferri, et. al., 2005). La Organización Mundial de la Salud estimó que en 2005 el 0.379% de las personas a nivel mundial tenían demencia y que la prevalencia aumentaría a un 0.441% en 2015 y aun 0.556% en 2030 (World Health Organization 2006) Varios estudios han llegado a las mismas conclusiones (Ferri, et. al., 2005). Otro estudio estimó que el año 2006, un 0.4% de la población mundial (entre 0.17 - 0.89%; valor absoluto aproximadamente 26,6 millones o entre 11,4 - 59,4 millones) se vería afectado por la EA y que la prevalencia triplicaría para el año 2050 (Brookmeyer, et. al., 2007).

1.1. ANATOMIA DEL CEREBRO.

1.1.1. CEREBRO.

El cerebro humano pesa cerca de 1.350g, de los cuales aproximadamente el 15%, o unos 200 ml, corresponde a líquidos extracelulares. El volumen de sangre intracelular representa unos 100 ml, la mitad de ellos son líquidos extracelulares y el volumen de LCR craneal suma otros 100 ml (Matthew, et. al., 2006) Los hemisferios cerebrales, con sus cubiertas, constituyen la parte principal del encéfalo. Estos hemisferios son "espejos gemelos", cada uno con un equipo completo de centros para las actividades sensitivas y motoras del cuerpo, y cada uno relacionado con la mayor parte de un lado del cuerpo, es decir, el lado derecho del cerebro controla el lado izquierdo del cuerpo y el lado izquierdo del cerebro controla el lado derecho del cuerpo. Los centros nerviosos que gobiernan todas las actividades sensitivas y motoras, así como las áreas todavía mal definidas supuesta sede de la razón, memoria e inteligencia están localizadas en los hemisferios cerebrales (Figura 1) (Stanley, et. al., 1985).

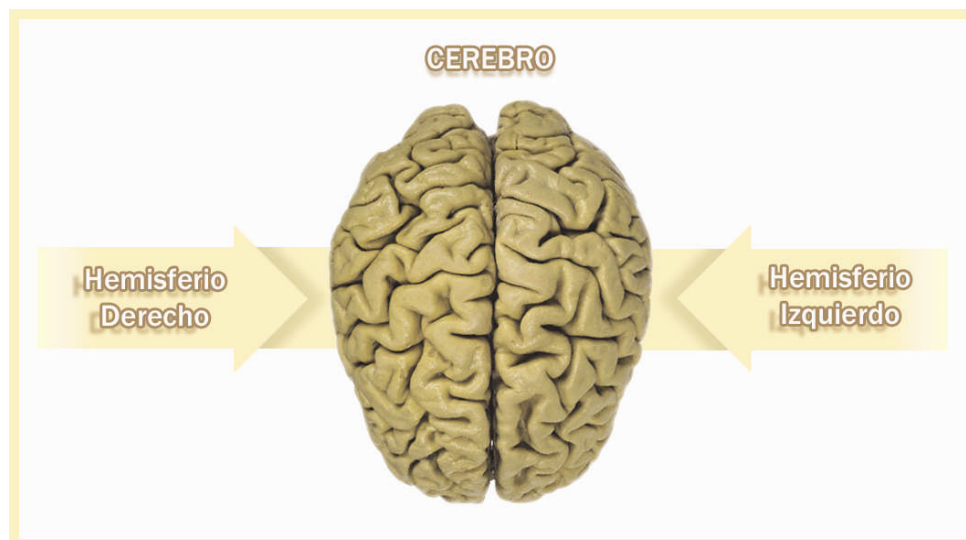


Figura 1. Fotografía de un cerebro humano, muestra los hemisferios del cerebro. (Diseñada por D.G. Sergio Cruz)

El hemisferio izquierdo, que tiene que ver con las funciones de: escritura, lógica, razonamiento y música rítmica. Está asociado con el intelecto, pensamiento convergente, abstracto, analítico, calculado, lineal, secuencial y objetivo; se concentra en los detalles y en las partes del todo. Produce pensamientos que son directos, verticales, sensibles, realistas, fríos, poderosos y dominantes. (Rangel, et. al., 2008) Procesa la información analítica y secuencial, paso a paso, de forma lógica y lineal; es el que analiza, abstrae, cuenta, mide el tiempo, planea procedimientos paso a paso, verbaliza, piensa en palabras y en números; es decir, contiene la capacidad para las matemáticas y para leer y escribir. Este hemisferio emplea un estilo de pensamiento convergente obteniendo nueva información al usar datos ya disponibles, formando nuevas ideas o datos que ya tiene. Aprende de la parte al todo y absorbe rápidamente los detalles, hechos y reglas; analiza la información; capta los componentes uno por uno. (Matthew, et. al., 2006).

Por otra parte, el hemisferio derecho tiene relación con las funciones de intuición, emoción, imaginación, creatividad artística y la música melódica; también controla el lenguaje y los pensamientos lógicos, está involucrado en la creación de imágenes y también en lo que se conoce como inspiración, parece especializado en la percepción global, sintetizando la información que le llega. Con él vemos las cosas en el espacio, y cómo se combinan las partes para formar el todo. (Matthew, et. al., 2006). Gracias al hemisferio derecho, entendemos las metáforas, soñamos, creamos nuevas combinaciones de ideas. Es el experto en el proceso simultáneo o de proceso en paralelo; es decir, no pasa de una característica a otra, sino que busca características similares. Procesa la información de manera global, partiendo del todo para entender las distintas partes que componen ese todo. Produce pensamientos que son flexibles, divertidos, complejos, visuales, diagonales, místicos y sumisos. (Rangel, et. al., 2008)

1.1.2. CORTEZA CEREBRAL.

La corteza cerebral es la capa externa gris de los hemisferios cerebrales. La división real del cerebro en lóbulos obedece a conveniencia para la descripción; estos lóbulos llevan el nombre de los huesos del cráneo que están situados encima de ellos e incluyen lóbulos frontal, parietal, temporal y occipital (Figura 2) (Stanley, et. al., 1985).

Por otro lado el sistema nervioso se compone de un tejido especial que contiene dos tipos principales de células: neuronas, los elementos conductores activos, neuroglia y los elementos de sostén (Ganong, et. al., 2002).

El sistema nervioso consiste en una agregación celular muy compleja, parte de la cual forma una red de comunicación y el resto una matriz de soporte. La red de comunicación está formada por neuronas que son la unidad funcional del sistema nervioso. Se estima que en cada milímetro del cerebro hay cerca de 50.000 neuronas. (Guyton, 1993)

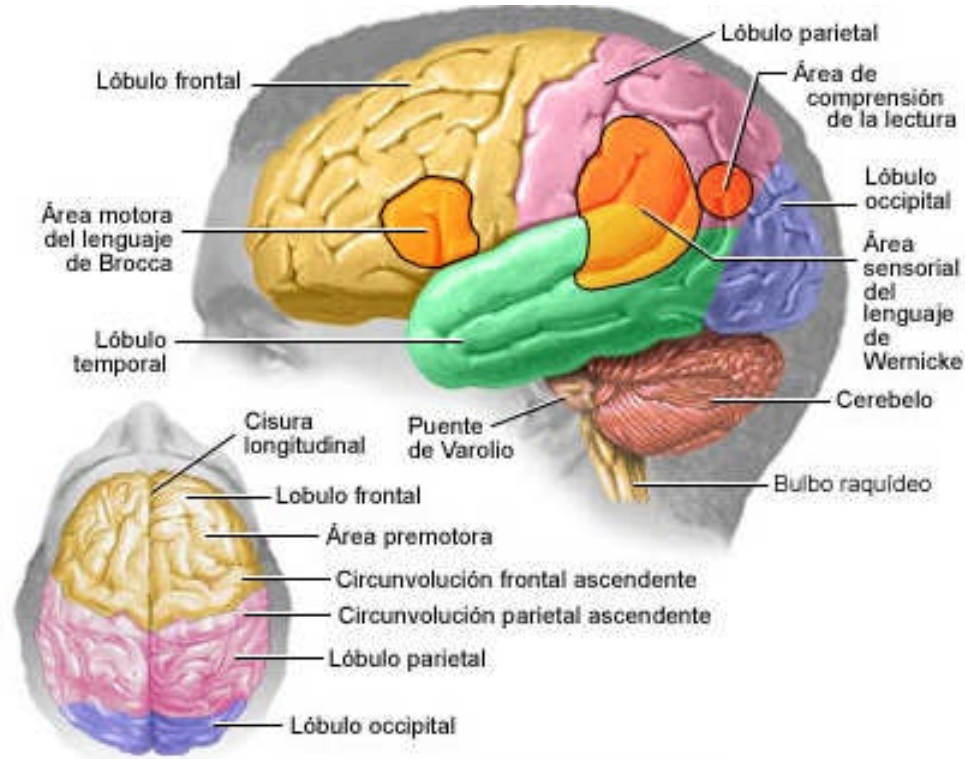


Figura 2. Lóbulos de la corteza cerebral, cara externa, lado izquierdo y vista superior (Stanley, et. al., 1985).

1.1.3. NEURONA.

La unidad básica del sistema nervioso es la neurona, o célula nerviosa. El cerebro humano contiene aproximadamente 10^{12} neuronas (Figura 3) Estas células están especializadas en recibir información, tomar decisiones al respecto y transmitir señales a otras neuronas o a células efectoras como el músculo o células glandulares (Matthew, et. al., 2006). Su especialización depende de diversos tipos de extensiones del cuerpo celular de una neurona, o soma. La mayoría de las neuronas tienen varias dendritas y un axón (Ganong, et. al., 2002). Las neuronas se comunican entre sí por medio de un proceso llamado sinapsis. Se inicia con una descarga químico-eléctrica en la membrana de la célula emisora o presináptica; una vez que este impulso nervioso alcanza el extremo del axón, la información se transmite a través de la conducción de una señal eléctrica (el impulso nervioso o potencial de acción) con lo cual se libera un neurotransmisor químico y comunica señales de información a la célula siguiente. La transmisión sináptica puede tener un efecto excitador o inhibidor (Hormuzdi SG, et. al., 2004).

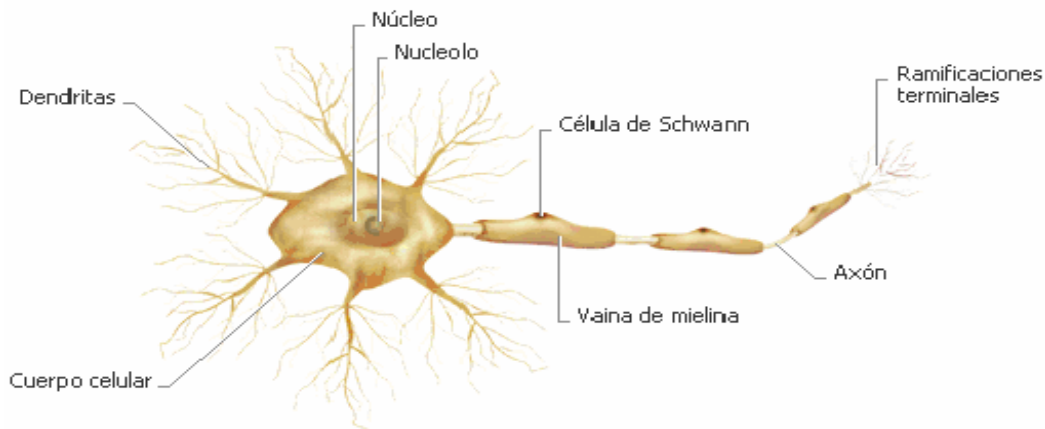


Figura 3. Esquema de una neurona, que muestra sus partes principales (Ganong, et. al., 2002).

Las células conjuntivas del SN están constituidas por la neuroglia (“pegamento de los nervios”). El cerebro humano tiene 10 veces más neuroglia que neuronas. En la figura 4 se muestran diversos tipos de neuroglia. Parte de estas células, denominadas astrocitos por su aspecto en forma de estrella en los cortes histológicos teñidos, contribuyen a mantener un medio local adecuado para las neuronas. Otro grupo, llamado oligodendroglía por su número reducido de prolongaciones, envuelve los axones para aumentar la velocidad de propagación de los impulsos nerviosos. La microglía son fagocitos que eliminan los productos resultantes de las alteraciones celulares del SNC. Probablemente derivan de la circulación (Ganong, et. al., 2002).

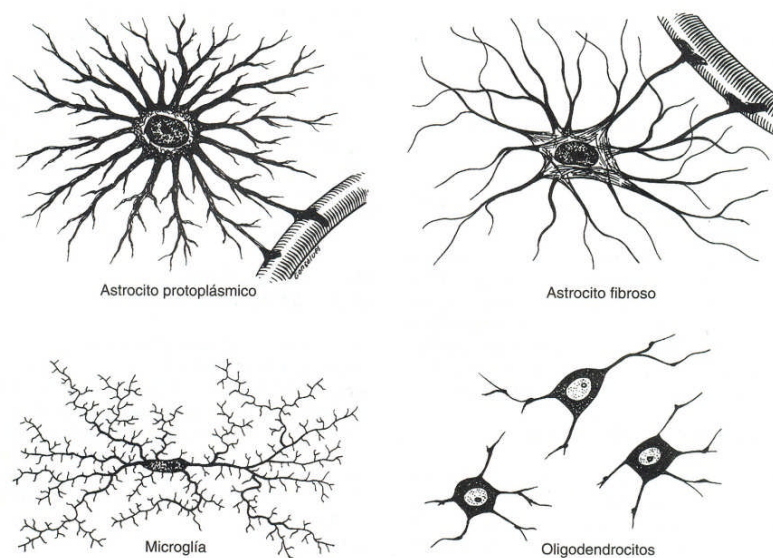


Figura 4. Las células gliales del encéfalo (Ganong, et. al., 2002).

1.2. METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS.

1.2.1. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LAS GRASAS.

Los triacilgliceroles proceden de tres fuentes principales: 1) la alimentación, 2) la biosíntesis de novo, en especial en el hígado y 3) las reservas existentes en los adipositos. El principal problema al que se enfrentan los animales en la digestión, absorción y transporte de los lípidos procedentes de la alimentación es la insolubilidad de estas sustancias en los medios acuosos. La acción de las sales biliares, sustancias detergentes secretadas por la vesícula biliar es esencial para la digestión de los lípidos y su absorción a través de la mucosa intestinal. El problema del transporte por la sangre y la linfa se resuelve en parte con la formación de complejos de lípidos con proteínas para formar unos agregados insolubles denominados lipoproteínas, éstos forman agregados moleculares distintos entre sí, varían extensamente en tamaño, pero virtualmente todas parecen ser microemulsiones (Jameson, et. al., 1998).

Los productos de la digestión de las grasas comprenden una mezcla de glicerol, ácidos grasos libres, monoacilgliceroles y diacilgliceroles. Menos del 10% de los triacilgliceroles originales permanece sin hidrolizar. Durante la absorción a través de las células de la mucosa intestinal, se produce una abundante resíntesis de triacilgliceroles a partir de los productos de hidrólisis. Esta nueva síntesis de triacilgliceroles tiene lugar en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi de las células de la mucosa. Los triacilgliceroles van a parar al sistema linfático formando complejos con proteínas para dar lugar a las lipoproteínas denominadas quilomicrones. El quilomicrón constituye también un transporte del colesterol en el organismo y éstos son tan sólo una de las clases de lipoproteínas que se encuentran en el torrente sanguíneo (Mathews, et. al., 2000)

Estos complejos desempeñan un papel esencial en el transporte de los lípidos a los tejidos, ya sea para el almacenamiento de energía, o para su oxidación. Los lípidos libres son todos casi indetectables en la sangre. Las apoproteínas, o las cadenas polipeptídicas de las lipoproteínas se sintetizan principalmente en el hígado, aunque alrededor del 20% se producen en las células de la mucosa intestinal (Jameson, et. al., 1998).

1.2.2. CLASIFICACIÓN Y FUNCIONES DE LAS LIPOPROTEÍNAS.

Se han descrito diversas familias de lipoproteínas, cada una de las cuales desempeña funciones concretas en el transporte de lípidos. Estas familias se clasifican en función de su densidad, determinada mediante centrifugación. (Tabla 1)

Tabla 1. Propiedades de las principales clases de apoproteínas plasmáticas humanas (Mathews, et. al., 2000).

	QUILOMICRONES	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densidad (g/ml)	<0.95	0.950 – 1.006	1.006 – 1.019	1.019 – 1.063	1.063 – 1.210
Componentes (% de peso seco)					
Proteínas	2	8	15	22	40 – 50
Triacilgliceroles	86	55	31	6	4
Colesterol libre	2	7	7	8	4
Ésteres de colesterol	3	12	23	42	12 – 20
Fosfolípidos	7	18	22	22	25 –30
Composición de apoproteínas	A-I, AII, B-48, C-I, C-II, C-III	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II C-I, C-II, C-III, D, E

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares esféricos con cubierta de unos 20 Å formados por un núcleo que contiene lípidos apolares (colesterol esterificado y triglicéridos) y una capa externa polar formada por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas (apolipoproteínas). Las apolipoproteínas son proteínas unidas a lípidos y su función principal es mantener la estructura de la lipoproteína y regular el metabolismo y transporte de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol entre los órganos. (Murray, et. al., 2008). En las lipoproteínas humanas se encuentran un total de nueve apolipoproteínas principales. En su mayoría son sintetizadas por el hígado y algunas otras por el intestino delgado. Fueron denominadas en un orden alfabético arbitrario. (Fauci, et. al., 2007). Sus propiedades se resumen en la Tabla 2. Dado que los lípidos tienen una densidad mucho menor que las proteínas, el contenido lipídico de una clase de lipoproteínas está inversamente relacionado con su densidad. La clasificación estándar de las lipoproteínas incluye, por orden creciente de densidad; quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Algunos esquemas de clasificación establecen dos clases de HDL, y a demás existe una lipoproteína cuantitativamente menor denominada lipoproteína de muy alta densidad (VHDL) (Mathews, et. al., 2000).

Tabla 2. Apoproteínas de las lipoproteínas plasmáticas humanas (Mathews, et. al., 2000).

APOPROTEÍNA	PESO MOLECULAR	CARACTERÍSTICAS
A-I	28300	Proteína principal de las HDL; activa la CLAT
A-II	17400	Proteína principal de las HDL
B-48	241000	Se encuentra exclusivamente en los quilomicrones
B-100	513000	Proteína principal de las LDL
C-I	7000	Se encuentra en los quilomicrones; activa la LCAT y la LPL
C-II	10000	Se encuentra principalmente en las VLDL; activa la LPL
C-III	9300	Se encuentra principalmente en los quilomicrones, las VLDL y las HDL; inhibe las LPL
D	35000	Proteína de las HDL; también denominada proteína de la transferencia de los ésteres de colesterol
E	33000	Se encuentra en las VLDL, HDL y LDL

A pesar de sus diferencias de composición lipídica y proteica, todas las lipoproteínas comparten características estructurales comunes, especialmente una forma esférica. (Figura 5)

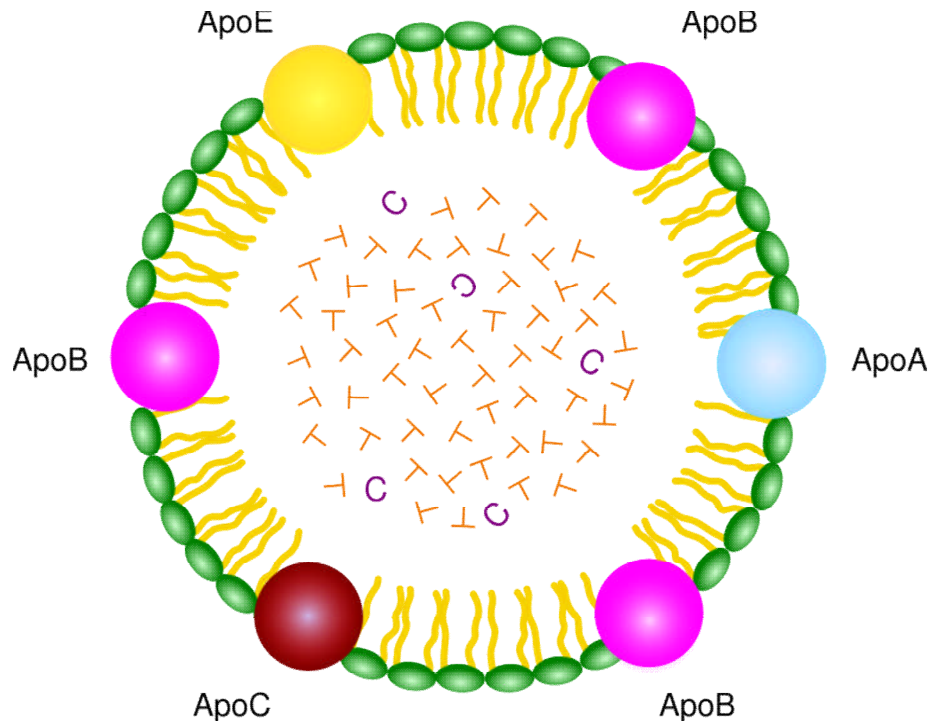


Figura 5. Estructura de una lipoproteína (quilomicrón) ApoA, ApoB, ApoC, ApoE (apolipoproteínas); T (triacilglicerol); C (colesterol); verde (fosfolípidos) (Murray, et. al., 2008).

Algunas apolipoproteínas poseen actividades bioquímicas específicas distintas del papel que desempeñan como transportadores pasivos de los lípidos de un tejido a otro (como es el caso de apo C-II que es un activador de la hidrólisis de los triacilglicerol). Otras dirigen determinadas lipoproteínas hacia las células específicas, al ser identificadas por receptores de las membranas plasmáticas de estas células. Así, por ejemplo, la apo E es captada principalmente por las neuronas por lo que una forma variante de ella, es asociada con un aumento del riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Mathews, et. al., 2000).

1.2.3. TRANSPORTE Y UTILIZACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS.

El transporte de los lípidos desde el hígado hacia los tejidos periféricos y de estos nuevamente al hígado se realiza a través de las interconversiones metabólicas de la VLDL, IDL, LDL y HDL; donde la principal implicada es la Lipasa de Triglicéridos Hepática: HTGL esta enzima es capaz de eliminar TAG

de los restos de VLDL. Otro sistema enzimático muy importante es el de la Lecitina Colesterol Transferasa (LCAT) enzima que cataliza el fosfolípido superficial y el colesterol libre en ésteres de colesterol y lecitina estos son transferidos a las VLDL y finalmente a las LDL. Por último hay otra enzima muy implicada que es la Proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) que intercambia los ésteres de colesterol que contienen las HDL con TAG de los quilomicrones y las VLDL (Fauci, et. al., 2007). Los quilomicrones constituyen la forma en que se transporta la grasa del alimento desde el intestino a los tejidos periféricos, especialmente el corazón, el músculo y el tejido adiposo. (Figura 6). Las VLDL desempeñan un papel comparable para los triacilglicerol sintetizados en el hígado. Los triacilglicerol en ambas lipoproteínas se hidrolizan a glicerol y ácidos grasos en las superficies internas de los capilares de los tejidos periféricos (Florence, et al., 2001).

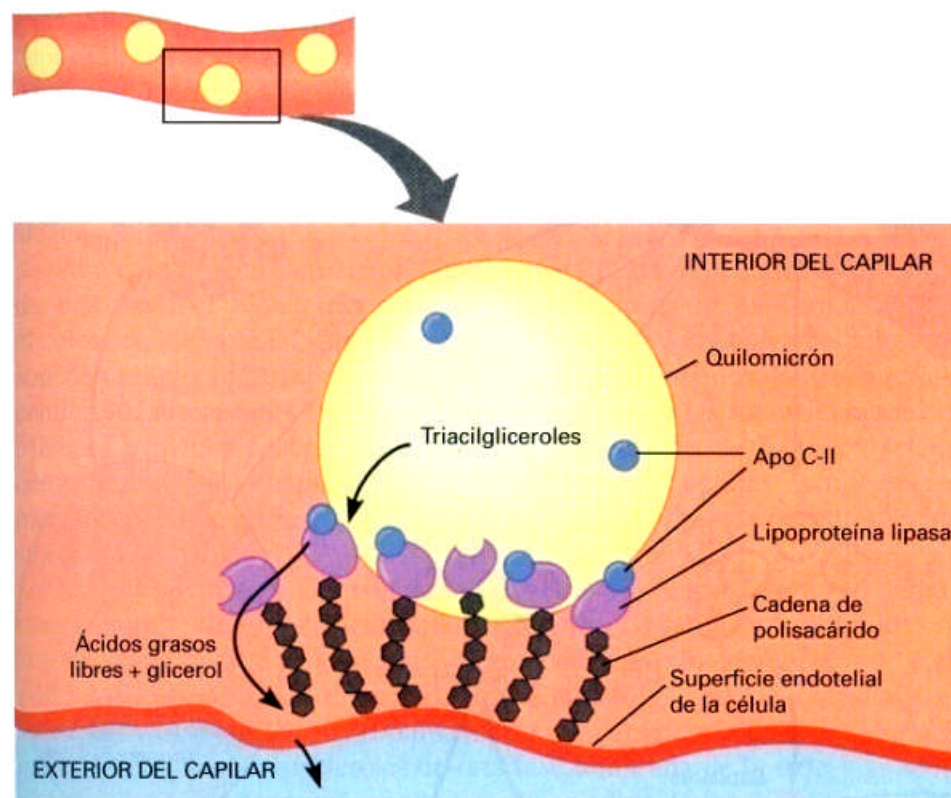


Figura 6. Unión de un quilomicron a la lipoproteína lipasa en la superficie interna de un capilar (Mathews, et. al., 2000).

Esta hidrólisis comporta una activación de la enzima extracelular lipoproteína lipasa por la apoproteína C-II. Algunos de los ácidos grasos liberados se absorben por las células próximas, mientras que otros, que continúan siendo bastante insolubles, forman complejos con la albúmina sérica para ser transportados a células más distantes. Tras la absorción en la célula, el glicerol y los ácidos grasos procedentes de la acción de la lipoproteína lipasa pueden catabolizarse para generar energía o, en las células adiposas, utilizarse para

volver a sintetizar triacilglicerolos. (Murray, et. al., 2008) Los aspectos generales del metabolismo y transporte de las lipoproteínas se resumen en la siguiente figura:

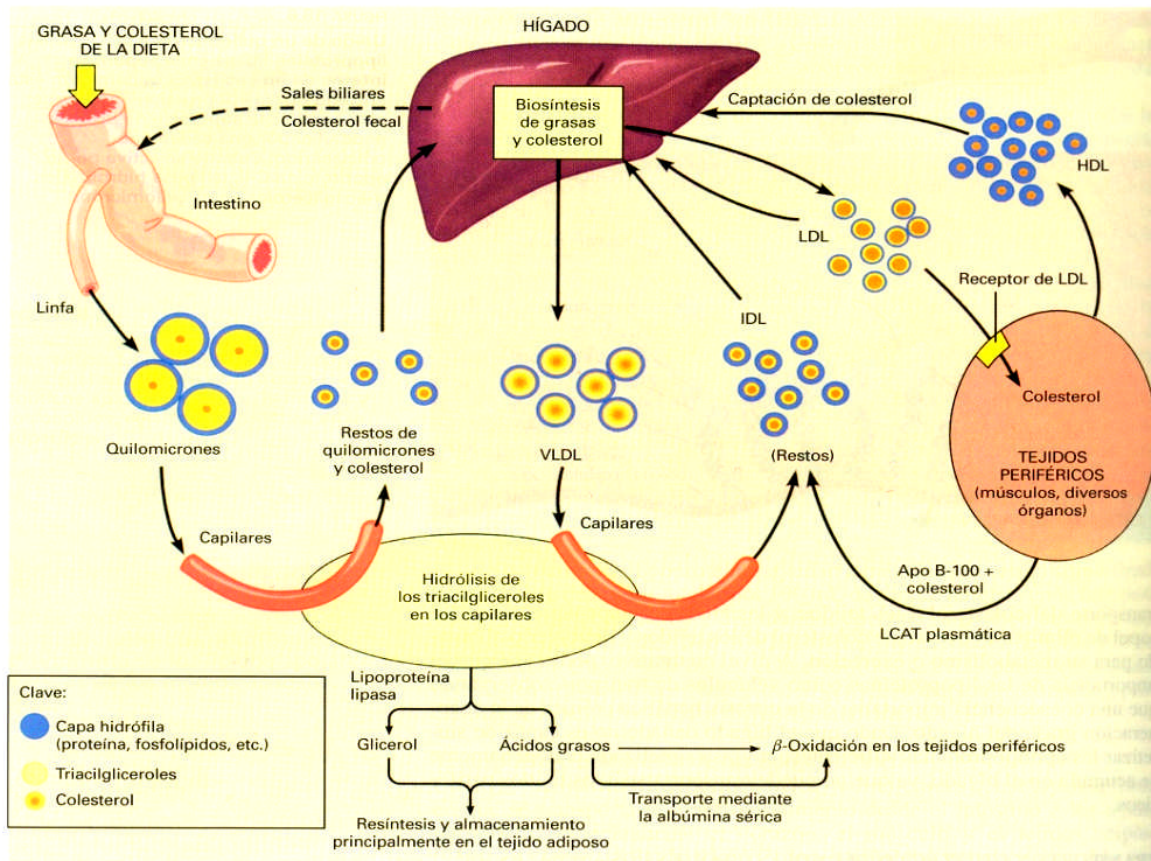


Figura 7. Visión general de las rutas de transporte y del destino de las lipoproteínas (Mathews, et. al., 2000).

Como consecuencia de la hidrólisis de los triacilglicerolos en los capilares, tanto los quilomicrones como las VLDL se degradan para dar lugar a restos ricos en proteínas. La clase de lipoproteínas IDL procede de las VLDL, y los quilomicrones se degradan para dar lugar a lo que se denominan simplemente restos de quilomicrones. Ambos tipos de restos son captados por el hígado a través de la interacción con receptores específicos y degradados posteriormente en los lisosomas hepáticos. Las apoproteína B-100 se reutilizan en la síntesis de las LDL (a través de las IDL). Las LDL constituyen la principal forma de transporte del colesterol a los tejidos, y las HDL desempeñan el principal papel para eliminar el exceso de colesterol de los tejidos y devolverlo al hígado para su metabolismo o excreción (Mathews, et. al., 2000).

1.3. DEMENCIA.

La demencia es un síndrome complejo, caracterizado por un estado de progresivo deterioro psíquico, en el que se aprecia un deterioro de las facultades intelectuales, fruto de lesiones del sistema nervioso central, que producen alteración del cerebro de causa degenerativa e irreversible. Su causa puede deberse a los efectos fisiológicos directos de una enfermedad, a los efectos tóxicos persistentes de una sustancia o a múltiples etiologías; está relacionado con lesiones cerebrales de tipo vascular, degenerativo, traumático, tóxico, infeccioso o tumoral (Florence, et al., 2001).

1.3.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una forma de demencia por lo cual es un trastorno mental progresivo, multifactorial y que conlleva a un deterioro sostenido y multidimensional de la función intelectual, empeorando con el paso del tiempo hasta provocar incapacidad total y muerte (Florence, et al., 2001). Esta enfermedad se inicia, por lo general, a los 60 años y el riesgo de contraerla aumenta con la edad. Aunque las personas más jóvenes también pueden desarrollarla, es mucho menos común entre ellas. Cerca de un 5 por ciento de hombres y mujeres entre los 65 y los 74 años de edad tienen Alzheimer, y casi la mitad de aquellos que tienen 85 años de edad en adelante pueden tener la enfermedad. Sin embargo, es importante advertir que la enfermedad de Alzheimer no es parte del proceso natural de envejecimiento (Enzo, et. al., 2004). Los pacientes pueden presentar pérdida de la memoria reciente y alteraciones del juicio, sobre todo en las situaciones sociales y las que requieren de una determinada actitud moral, descuido en el arreglo e higiene personal y pérdida de la vergüenza (Andreoli, et. al., 1999). Su capacidad de atención disminuye, en ocasiones sufren de labilidad emocional, caracterizada por cambios rápidos del humor y crisis de llanto, rabia o risa. Todo esto debido a que se da la pérdida progresiva de neuronas en la totalidad de la corteza cerebral afectando preferencialmente al lóbulo frontal, siendo éste el área que controla las funciones intelectuales superiores en el hombre. Uno de los últimos síntomas que pueden presentarse en esta enfermedad es la incontinencia urinaria ya que el lóbulo paracentral el cual participa en el control de las funciones vesicales (particularmente en la inhibición de los reflejos medulares propios de la micción) se encuentra en la porción media del lóbulo frontal (Florence, et al., 2001).

La EA esta considerada como la principal causa de demencia y ésta, es la cuarta causa de muerte en países desarrollados. Constituye la tercera enfermedad en costos sociales y económicos superada sólo por la cardiopatía isquémica y el cáncer (Ferri, et. al., 2005; Brookmeyer, et. al., 2007).

Existen varios factores que pueden ser asociados con un incremento en el riesgo a padecer la enfermedad de Alzheimer, pero de la misma manera existen factores que se cree reducen el riesgo a padecerla. (Tabla 3) (Florence, et al., 2001).




Tabla 3. Algunos factores de riesgo y factores de protección para la presentación de Alzheimer (Florence, et. al., 2001).

FACTORES DE RIESGO	FACTORES DE PROTECCIÓN
Edad	Alto nivel de educación
Historia familiar con demencia	Consumo moderado de vino
Lesiones en la cabeza	Uso de terapia sustitutiva de hormonas femeninas
Síndrome de Down	Uso de fármacos anti-inflamatorios
Enfermedad de Parkinson	
Depresión	
Hipotiroidismo	
Incremento en la concentración de aluminio en el agua para beber	
Consumo de tabaco	
Abuso en el consumo de alcohol	
Factores de riesgo vasculares	
Diabetes	

Se aceptan como definición dos grupos de EA según la edad de inicio del cuadro clínico:

- Forma presenil o temprana (EA de inicio precoz): generalmente con agregación familiar; comienza antes de los 65 años de edad y constituye el 5 al 10% de todos los casos.
- Forma senil o tardía (EA de inicio tardío): aparece después de los 65 años de edad; en su mayor parte esporádica, y representa entre el 90 y 95% de todos los casos (Guimerá, et. al., 2002).

En las formas familiares se han identificado 3 genes diferentes cuyas mutaciones conducen a la acumulación del péptido β amiloide involucrado en la fisiopatología de la enfermedad. Los genes descritos hasta el momento asociados como factor causal de la EA familiar son:

-  El gen de la presenilina 1 (PS1) ubicado en el cromosoma 14.
-  El gen de la presenilina 2 (PS2) ubicado en el cromosoma 1.
-  El gen precursor de la proteína β amiloide en el cromosoma 21. Siguiendo un patrón de herencia autosómico dominante.

La enfermedad de Alzheimer esporádica, no tiene un patrón de herencia definido y puede presentarse tempranamente o no.

Por otro lado se asocia que al presentarse ciertos polimorfismos en el gen de la Apolipoproteína E, más concretamente el alelo $\epsilon 4$ incrementa el riesgo en la aparición de la enfermedad en cualquiera de sus formas (Sorbi, et. al., 2001).

1.4. NEUROPATOLOGÍA

1.4.1. PATOLOGÍA MACROSCÓPICA.

Hay que entender que la severidad de la enfermedad radica en la afectación a la corteza cerebral en general, lo cual implica que se afecten varias áreas del cerebro y aunque la afectación del lóbulo temporal es la más común, también puede afectarse el lóbulo parietal, el lóbulo frontal, el lóbulo occipital, las áreas de proyección y áreas de asociación (Ferri, et. al., 2005).

Las alteraciones están tipificadas por atrofia generalmente simétrica y difusa de los giros cerebrales (Figuras 8 y 9), que se evidencia en la disminución del espesor de las circunvalaciones, aumento en la profundidad de los surcos, dilatación del sistema ventricular y disminución del peso y volumen cerebral (existe una correlación negativa entre el peso del encéfalo y el tiempo de evolución de la enfermedad) (Guimerá, et. al., 2002).



Figura 8. Visión superior del cerebro de un paciente con EA. En el hemisferio izquierdo ha sido eliminada la aracnoides y gran parte de los vasos que ocupan el espacio subaracnoideo. Nótese la marcada atrofia cerebral difusa que caracteriza a la EA, en el ensanchamiento de las fisuras y el adelgazamiento de las circunvalaciones (Guimerá, et. al., 2002).

Figura 9. Cortes coronales de un hemisferio provenientes de un paciente con Alzheimer. Nótese la marcada atrofia cortical así como subcortical, puesta de manifiesto en la dilatación de las cavidades ventriculares (Guimerá, et. al., 2002).



El patrón de atrofia más común es el difuso, seguido por una combinación de atrofia fronto-temporal, frontal o temporal aisladas, y en menor proporción puede haber un compromiso parieto-occipital (Guimerá et. al., 2002). Secciones a través de los hemisferios cerebrales revelan un adelgazamiento de la lámina cortical y dilatación simétrica del sistema ventricular (Figura 10). Los ganglios basales, diencefalo, mesencéfalo y el tronco cerebral no muestran anomalías notables. El cerebro no muestra lesiones francas (Wenk, 2003).

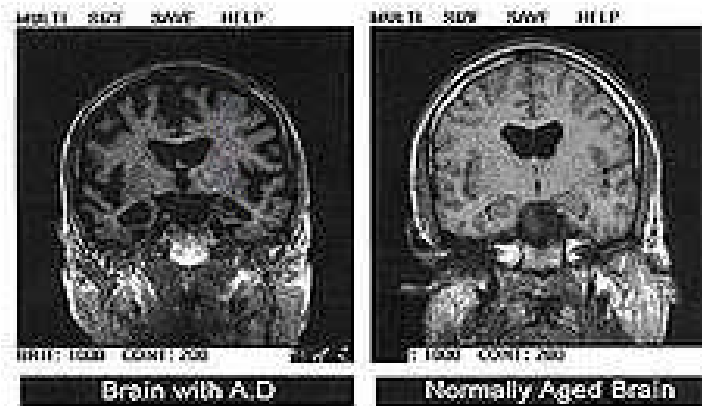


Figura 10. Cerebro con enfermedad de Alzheimer (derecha), comparado con uno normal (izquierda) en imágenes capturadas por resonancia magnética nuclear (Wenk, 2003).

1.4.2. PATOLOGÍA MICROSCÓPICA.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza esencialmente por 2 tipos de lesiones cerebrales:

- Las placas seniles.
- Las degeneraciones neurofibrilares.

Las placas seniles están constituidas por una proteína denominada β amiloide o péptido β amiloide. Esta proteína se metaboliza para crear una cadena corta de 40 (β A40) aminoácidos y 2 cadenas largas de 42 aminoácidos (β A42 y β A43). La causa de la formación en exceso de péptido β A es debida a una mutación en el gen que codifica para esta proteína. (Wenk, 2003). Las placas seniles (Figura 11) son lesiones esféricas, bien delimitadas, que pueden tener 150 μ m de diámetro. Se ubican en la zona de la corteza cerebral, principalmente en el área asociativa. Son depósitos densos de prolongaciones nerviosas degeneradas, lo que indica que estas lesiones se sitúan fuera de la célula (Guimerá, et. al., 2002).

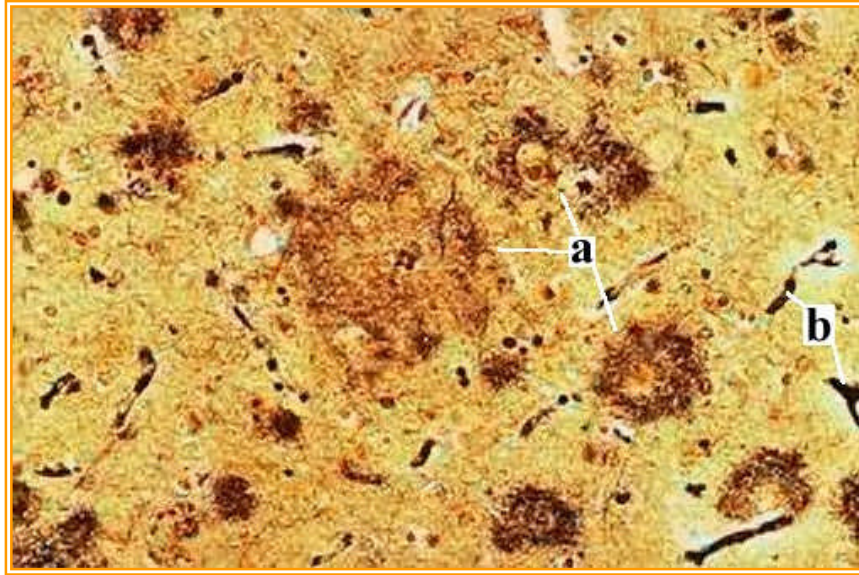


Figura 11. Sección de tejido de un caso de EA. (a) Se observan unas placas neuríticas, estas son lesiones complejas que contienen amiloide, procesos neuríticos distróficos y células gliales reactivas. (b) También se pueden observar DNF (Guimerá, et. al. 2002).

Las degeneraciones neurofibrilares son intra celulares (Figura 12). Son constituidas principalmente por una proteína Tau anormalmente fosforilada (Guimerá, et. al., 2002).

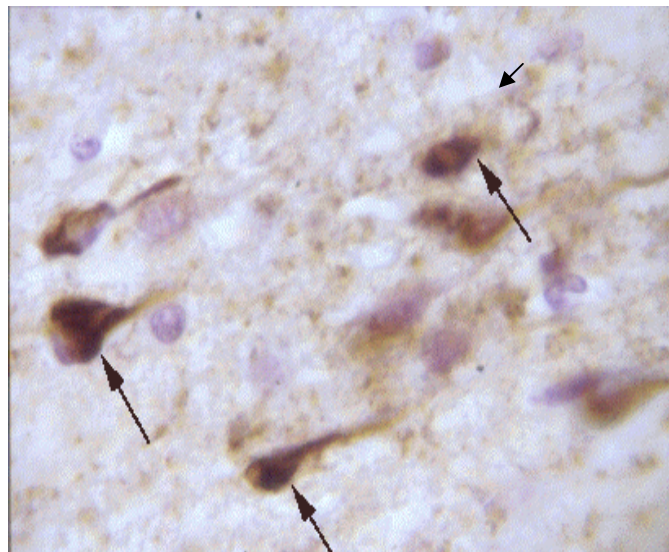


Figura 12. Corteza cerebral de un paciente con EA que muestra DNF (señaladas por flechas) en neuronas de tamaño medio, puestas en manifiesto con inmunotinción para la proteína Tau (Guimerá,et. al., 2002).

La proteína Tau es un constituyente de los neurofilamentos que forman a los microtúbulos del citoesqueleto. Esta proteína es codificada por un solo gen que contiene 16 exones y que se localiza en el cromosoma 17. La proteína Tau es una fosfoproteína que sufre procesos de fosforilación y desfosforilación en el extremo C terminal (Andersen, et. al., 1999) Desfosforilaciones anormales provocan la agregación de proteína Tau en pares de fragmentos en forma de hélice lo que atrofia a los microtúbulos, (Figura 13) provocando así degeneración córtico - basal, parálisis supranuclear progresiva, demencias frontales y fronto temporales en la enfermedad de Alzheimer (Wenk, 2003).



Figura 13. Imagen microscópica de una degeneración neurofibrilar, conformado por una proteína tau hiperfosforilada (Wenk, 2003).

El concepto de "Taupatías" existe para designar las enfermedades que se producen por componentes agregados intra neuronales de proteína Tau anormalmente fosforilada. Estas fosforilaciones están genéticamente determinadas, por mutaciones en el gen que codifica para la proteína Tau. En el caso de la enfermedad de Alzheimer se ha identificado que una mutación en el gen produce más de 3 proteínas Tau anormales cuyos pesos son: 60, 64 y 68 kD (Wenk, 2003; Chun y Johnson 2007).

Las primeras lesiones aparecen en la región de la cara interna del lóbulo temporal, abarcando el área asociativa (implica atrofia de la información), el hipocampo (daño de la memoria), hasta producir una invasión a la corteza temporal, parietal y frontal (produciendo daño de la memoria, lenguaje y abstracción) (Ferri, et. al., 2005).

Existe una correlación entre el deterioro intelectual y la densidad de las degeneraciones neurofibrilares en la corteza cerebral del hipocampo (Guimerá, et. al., 2002)

La pérdida neuronal afecta particularmente a las capas superficiales de la corteza, y representa aproximadamente un 36% de la población neuronal. Las neuronas que sobreviven exhiben un nucléolo pequeño anormal y una

reducción del ARN citoplasmático. Estudios comparativos de cromatina muestran un descenso en la cantidad de eucromatina con un incremento correspondiente de heterocromatina en neuronas y células gliales. Esto puede ser interpretado como una consecuencia de la reducción en la capacidad transcripcional (Guimerá et. al., 2002; Chun y Johnson 2007).

En el campo de los neurotransmisores, la característica más marcada es el descenso en la actividad colinérgica. La reducción en acetilcolintransferasa es el doble de la pérdida neuronal esperada en la corteza. Las terminales colinérgicas están particularmente afectadas. También están afectadas las neuronas de proyección que producen transmisores monoamina, y neuronas corticales que producen glutamato, GABA, somatostatina, neuropéptido Y, factor liberador de corticotropina, substancia P, y otros neuromoduladores. Existe una reducción en la actividad de neurotransmisor en los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico. No hay una correlación entre el grado de demencia y las anormalidades del sistema transmisor monoaminérgico. También se han encontrado reducciones en receptores muscarínicos en el hipocampo y receptores de GABA en el núcleo caudal (Guimerá, et. al., 2002).

1.5. ACTIVACIÓN MICROGLIAL Y MACROFÁGICA.

Uno de los procesos que contribuyen a exagerar la lesión neurodegenerativa es la reactividad microglial. Las células gliales regulan la actividad nerviosa ya que intervienen en fenómenos de plasticidad neuronal, supervivencia de las neuronas, nutrición neuronal, regulación del crecimiento, destoxificación y regulación homeostática (Guimerá, et. al., 2002).

Cuando el tejido nervioso sufre un daño, las células microgliales tienen la capacidad de actuar rápidamente y de manera heterogénea. Una vez activada, la microglía sufre cambios morfológicos, sobre expresa diferentes receptores y es capaz de migrar, proliferar y transformarse en formas específicas de microglía reactiva. La reactividad de la microglía, mediante la fagocitosis y la secreción de elevados niveles de citocinas, proteasas y otros factores, puede cumplir una función destructiva o bien puede desempeñar una función beneficiosa (Wenk, 2003)

La deposición de la proteína β amiloide induce una respuesta inflamatoria local. También induce la activación de la microglía, mediante dos receptores microgliales: el receptor RAGE (Advanced glycation end products receptor) y el receptor SR (scavenger receptor). La microglía activada por los efectos del β A experimenta una serie de cambios morfológicos asociados a un incremento de su metabolismo, expresión de novo de ciertas moléculas y sobreexpresión de otras ya presentes en la microglía inactiva. Esta actividad se ve asociada directamente al proceso de degeneración neuronal por ser una gran fuente de

radicales libres de oxígeno, contribuyendo a exagerar el estrés oxidativo y sus efectos neurodegenerativos (Bozena, et. al., 2003).

La forma reactiva de la microglía es un estado muy complejo que incluye fagocitosis y también síntesis y expresión de diferentes moléculas involucradas en el control de la inflamación local y en la modulación de la respuesta inmunológica. La fagocitosis está protagonizada por macrófagos, que invaden el área lesionada para eliminar remanentes celulares. El origen de estos macrófagos puede derivar de la microglía residente o de la infiltración de monocitos exógenos sanguíneos. Estos últimos invaden el tejido nervioso atraídos por factores quimiotácticos, como la trombospondina y las b- quimiocinas, secretadas por la microglía reactiva. La reacción inflamatoria protagonizada por la activación de la microglía viene asociada a una activación y proliferación de los macrófagos cerebrales (Prático, 2008).

1.6. GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD.

La mayoría de los casos de EA son esporádicos, pero se han identificado familias con EA de inicio temprano las cuales siguen un patrón de herencia autosómico dominante. Estudios genéticos han identificado que aproximadamente el 5% de los casos siguen este patrón y que son 3 los genes como los responsables de la enfermedad. El gen para la proteína precursora del β -Amiloide localizado en el cromosoma 21, el gen para la Presenilina-1 en el cromosoma 14, y el gen de la Presenilina-2 en el cromosoma 1. Las mutaciones en cualquiera de los 3 genes, resultan en el aumento de la producción del péptido β A de 42 aa que se deposita en mayor cantidad en el cerebro de los pacientes con EA y es una de las características primarias de la enfermedad (Prático, 2008). Por otro lado se ha asociado como factor de riesgo al gen de la Apolipoproteína E localizado en el cromosoma 19 pero el mecanismo por el cual actúa aun no está bien claro, inclusive existen opiniones encontradas en si tiene o no relación con la enfermedad (Liu, et. al., 2008).

1.6.1. PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE.

El primer gen en ser identificado en asociación con la susceptibilidad de presentar EA fue el gen del precursor de la proteína β amiloide (PP β A), el cual se encuentra ubicado en el cromosoma 21q21.2 y codifica una proteína que se sitúa en la transmembrana celular. La isoforma larga de esta proteína contiene 770 aminoácidos, y ésta contiene dos exones que codifican para un dominio en el que se localiza un inhibidor de proteasa Kunitz, así como la secuencia homóloga de 19 aminoácidos para el antígeno ox-2, y es expresado en muchos tejidos. En contraste, la isoforma corta contiene 695 aminoácidos y es predominantemente expresada en el cerebro. (Figura 14)

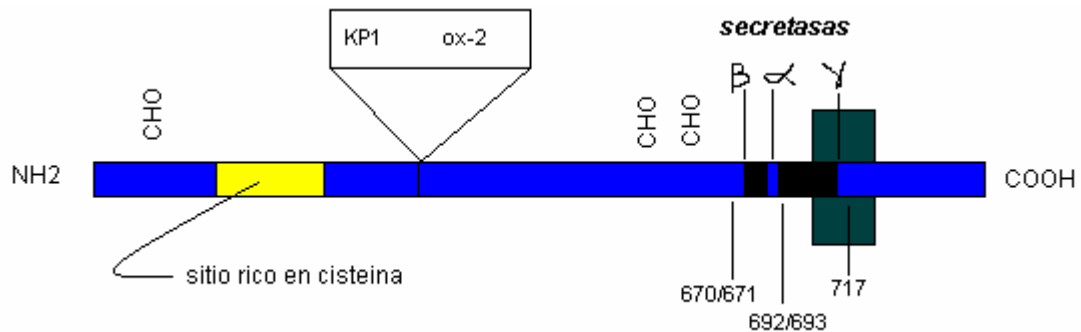


Figura 14. La imagen muestra el dominio funcional del gen del PPβA. El extremo N-terminal es localizado en la zona extra celular y contiene las señal del péptido (no se muestra), el sitio rico en cisteína, y varios sitios posibles para la O- y N- glicosilación (CHO). Los exones 7 y 8 del gen del PPβA están alternadamente empalmados el residuo 289 que codifica para el inhibidor de la proteasa Kunitz (KP1) y el dominio ox-2, respectivamente. El péptido βA (caja negra) abarca al final el dominio extracelular y parte en la transmembrana. El dominio C-terminal corto se localiza intracelularmente (Takahashi, et. al., 2008).

Se conocen otras formas raras de la proteína. La proteína inmadura sufre una O- y N- glicosilación y fosforilación, provocando así un error en el metabolismo que se realiza en el aparato de Golgi. El péptido βA sufre una división proteolítica produciéndose así una proteína de tamaño normal de 672 a 711 residuos de los cuales; los últimos 28 residuos son de dominio extracelular y los primeros 14 son dominios de la transmembrana. La función del gen PPβA es desconocido, aunque se propone que sea necesario para que la célula cumpla con funciones como la adhesión, el desarrollo sináptico, o la reparación neuronal (Takahashi, et. al., 2008).

La relación del gen del PPβA con la EA, se apoya en 5 observaciones:

1. El producto de la división proteolítica del PPβA de 40- a 43- aminoácidos es el principal componente de las placas amiloides en la EA (Guimerá, et. al., 2002).
2. Estudios genéticos en pacientes con historia familiar con Alzheimer (HFA) implican la existencia de un gen en aproximadamente la misma región del cromosoma 21 que el gen del PPβA (Prático, 2008).
3. Los pacientes con trisomía 21, que llegan a los 40 años invariablemente presentan lesiones neuropatológicas atribuidas a EA (Sorbi, et. al., 2001).
4. Una mutación sin sentido de una glutamato por glutamina en el codón 693 del gen de PPβA puede ser descubierto en sujetos con un raro desorden cerebro vascular que se sabe es hereditario y produce una hemorragia cerebral con amiloidosis (HCCA), que es caracterizada por depósitos de βA dentro de los vasos sanguíneos y con algunas placas amiloides en el parénquima cerebral (McNamara, et. al., 1998).
5. Estudios demuestran que el acumulo de PPβA en el cerebro de los pacientes con EA favorece el estrés oxidativo ya que en estudios pos mortem se han encontrado en el tejido dañado especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (Prático, 2008).

En análisis subsecuentes del gen del PP β A en una muestra de pacientes con historia familiar de Alzheimer y sus familias, se descubrieron otros 3 codones que producen otras mutaciones y fenotipos, como se resume en la tabla 4.

Tabla 4. Mutaciones en el gen PP β A (Fan, et. al., 2008).

CODÓN	MUTACIÓN	FENOTIPO
665	Gln \rightarrow Asp	Presentación tardía de EA, no segregación.
670/671	Lys-Met \rightarrow Asn-Leu	EAF, incremento de la producción de β A.
673	Ala \rightarrow Thr	Fenotipo no enfermo.
692	Ala \rightarrow Gly	EAF + hemorragia cerebral; incremento de β A.
693	Glu \rightarrow Gly	Presentación tardía de EA, no segregación.
713	Glu \rightarrow Gln	HCCA.
	Ala \rightarrow Val	Esquizofrenia, no segregación
717	Ala \rightarrow Thr	EA, no segregación
	Val \rightarrow Ile	EAF, incremento de la isoforma larga de β A
	Val \rightarrow Phe	EAF
	Val \rightarrow Gly	EAF

Numerosos estudios hechos en líneas de cultivo celular y muchos análisis de homogenizados de tejido cerebral sugieren que el PP β A se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso, pasa por el aparato de Golgi donde se glicosila y se empaqueta en vesículas de transporte, atraviesa el citoplasma y finalmente se inserta en la membrana celular en donde puede seguir dos vías metabólicas que compiten por la misma parte de la proteína. En la vía más común una α secretasa, fracciona a la PP β A en péptidos de β A con residuos entre Lys687 y Leu688, esto es, entre 16 y 17 residuos que corresponde a el fragmento amino-terminal largo y soluble y un fragmento carboxi-terminal, de 10 KD llamado C83, el cual permanece unido a la membrana para posteriormente ser procesado por γ secretasa. El resultado de esta nueva escisión es un péptido no dañino con un PM de 3 KD denominado P3, este proceso es conocido como Vía no amiloidogénica (Figura 15) (Fan, et. al., 2008).

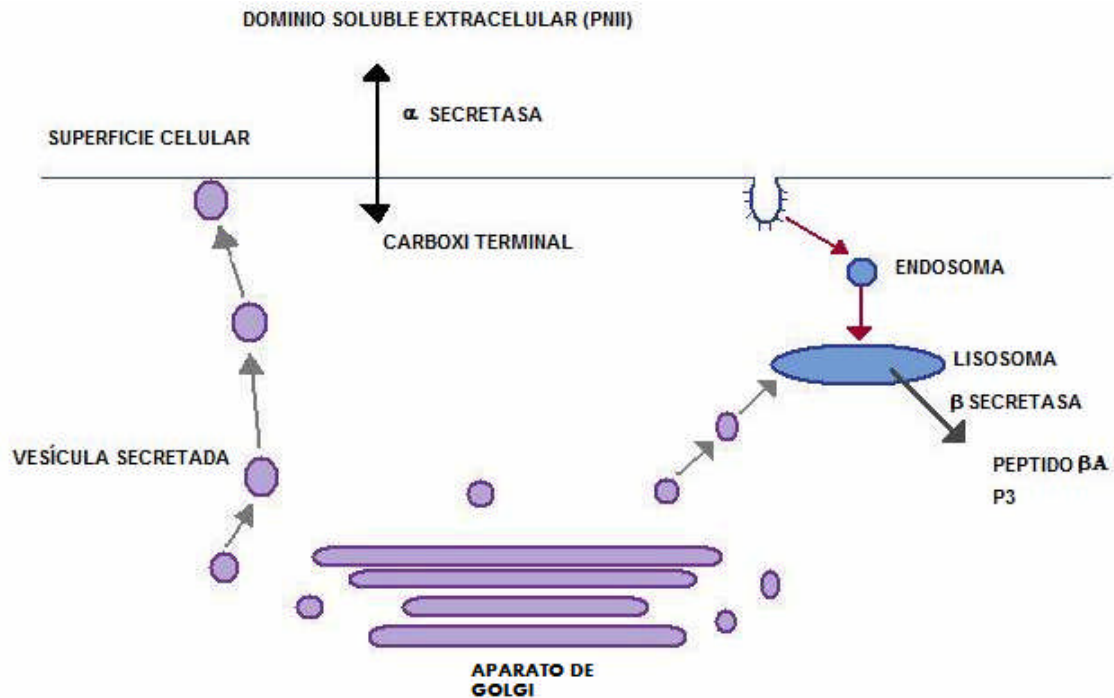


Figura 15. Esquema del proceso del PPβA. El PPβA inmaduro sufre una O- y N- glicosilación terminal en el aparato de Golgi, y es transportada a la superficie celular, donde puede ser dividida en el péptido βA por la α secretasa (vía no amiloidogénica) se libera el extremo soluble N- terminal mientras el extremo C- terminal es dividido por γ secretasa generando así el fragmento p3, o el PPβA maduro puede ser dividido pos aparato de Golgi, formando un complejo endosoma – lisosoma en el que los extremos N- y C- terminales del βA son liberados por la β secretasa y la γ secretasa, respectivamente para liberar el βA (vía amiloidogénica) (Fan, et. al., 2008).

En la otra vía una proteasa denominada β secretasa, corta al PPβA liberando un fragmento N-terminal soluble de 100 KD y un fragmento carboxi-terminal de aproximadamente 12 KD llamado C99 que también queda unido a la membrana y tras ser procesado por γ secretasa se produce un aumento en una serie de péptidos que contienen de 40 a 42 aminoácidos que corresponde al péptido βA (Fan, et. al., 2008) Al finalizar estas divisiones el βA con 40 residuos es la isoforma predominante producida durante el metabolismo normal de PPβA; la cual es relativamente soluble. Los péptidos βA terminales con 42 o 43 residuos, llegan a ser menos solubles por lo que se acumulan en el cerebro actuando como neurotóxicos (Ghania, et. al., 2008). Evidencias substanciales sugieren que estas isoformas pueden tener distintos sitios de acción en las neuronas en comparación con el βA40, lo cual puede producir una acumulación de lípidos como respuesta (Holmes, et. al., 2008).

La hipótesis del stress oxidativo plantea que la presencia de placas de βA en el cerebro así como las placas neurofibrilares colaboran a la patogénesis de la enfermedad; ya que se sabe que como parte de las reacciones metabólicas normales en la célula se generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno las cuales son químicamente inestables por lo que presentan una alta reactividad (Prático, 2008), debido a la acumulación del PβA en la célula la habilidad antioxidante de la misma se excede generándose alteración de la función

celular y se produce daño neuronal lo cual trae como consecuencia un proceso inflamatorio que está relacionado con una variedad de procesos (Ghania, et. al., 2008), entre ellos la formación de radicales libres, la obstrucción de la membrana mitocondrial, alteraciones en la homeostasis del calcio y el estrés oxidativo que conduce a activar los procesos de apoptosis celular (Holmes, et. al., 2008).

1.6.2. PRESENILINA-1 Y 2.

Estudios genéticos realizados en numerosas familias con casos de Alzheimer de presentación temprana muestran un locus en común en el cromosoma 14q24.3, y se le ha asociado con una forma particularmente agresiva de presentación temprana de EA (el inicio de la enfermedad se da entre los 30 a 60 años de edad), y en general el 50% de los casos con EAF presentan mutaciones en este gen, ya que es un tipo de herencia autosómica dominante. Este gen codifica para una proteína llamada Presenilina 1 (PS1) (Figura 16) (Zhu, et. al., 2008).

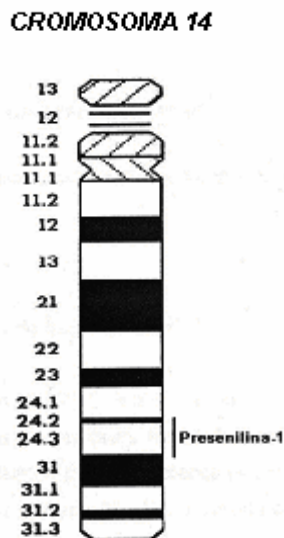


Figura 16. Cromosoma 14 con bandas G en el cual se muestra la localización del gen de la presenilina 1 (Zhu, et. al., 2008).

La función del gen PS1 no está bien dilucidada, pero gracias a estudios *in vitro* con amplificadores de ADNc se cree que muy probablemente es una proteína integral de la membrana y que cuenta con al menos 7 dominios en la parte hidrofóbica y dos dominios en la parte hidrofílica, localizados en el extremo N-terminal, 6 dominios en medio de la transmembrana y 7 dominios en la transmembrana (Figura 17) (Fraser, et. al., 2000).

Poco después del descubrimiento de PS1, se identificó un tercer gen, el cual mostró homología con PS1, el nuevo gen fue mapeado en el cromosoma

1q42.1, se le denomina gen de Presenilina 2 (PS2) y codifica para una proteína de 448 a.a (Jeffrey, et. al., 2002).

Todas las mutaciones en PS1 ocurren en sitios altamente conservados con PS2, la mayor parte de éstas mutaciones son puntuales y provocan un cambio en la estructura primaria de la proteína (Zhu, et. al., 2008).

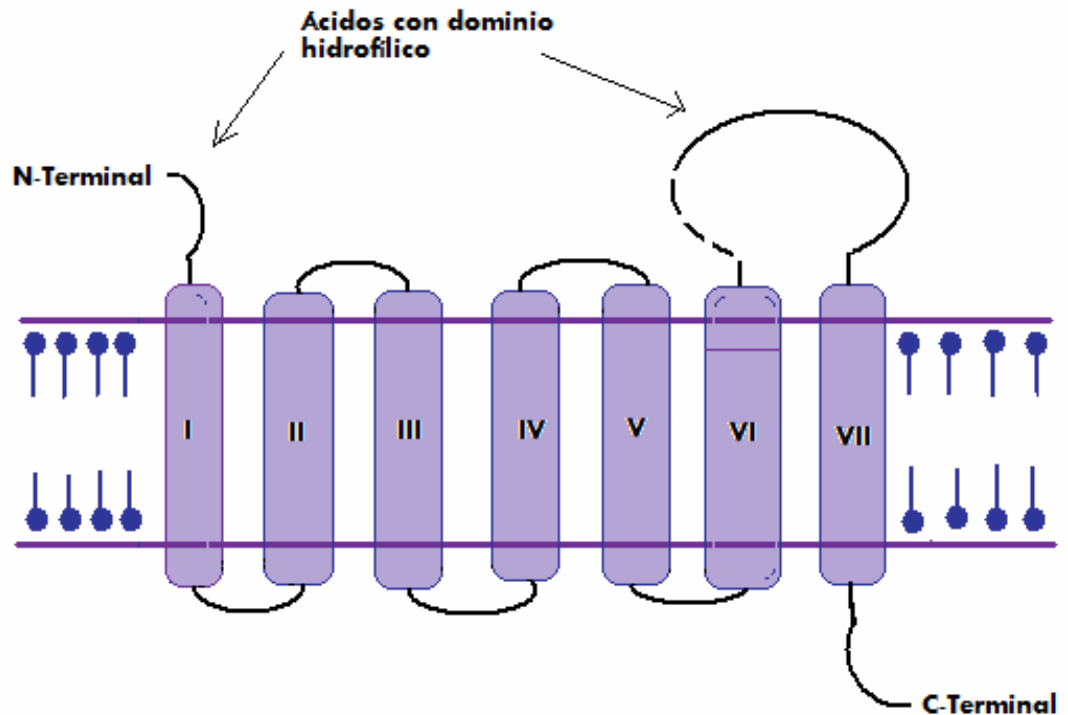


Figura 17. La figura muestra la posible estructura de los genes de presenilina. Líneas delgadas, secuencias que son pobremente conservadas entre los genes de presenilina 1 y presenilina 2; líneas oscuras, dominios conservados. La región señalada por asteriscos es alternativamente empalmada en algunos tejidos (Fraser, et. al., 2000).

Estudios realizados en secuencias de ADNc mostraron que al ser captadas por linfocitos T, tiene la capacidad de suprimir la apoptosis, además de que se encontró que la porción C-terminal de PS2 es homóloga a la de PS1. Se plantean tres propuestas sobre la función y relación de estas proteínas y la EA.

1. Estas proteínas son metabolizadas en el retículo endoplásmico o en el aparato de Golgi y son parte estructural de la membrana, lo cual es muy significativo ya que son los sitios en donde se metaboliza al PPβA (Jeffrey, et. al., 2002).
2. Tienen una función en la homeostasis intracelular de iones, particularmente en el metabolismo del calcio, el cual se ve afectado en pacientes con EA (Zhu, et. al., 2008).
3. Puede cumplir una función en la modulación de los mecanismos de muerte celular (Fan, et. al., 2008).

1.6.3. APOLIPOPROTEÍNA E.

La Apolipoproteína E (APOE) es esencial para el catabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos. APOE fue inicialmente reconocida por su importancia en el metabolismo de lipoproteínas y enfermedades cardiovasculares. Más recientemente, fue estudiada por su participación en diversos procesos biológicos directamente relacionados con el transporte de lipoproteínas, incluyendo la EA, inmunoregulación y cognición (Singh, et. al., 2006).

La APOE es una proteína que está constituida por 299 a.a, y su actividad tiene que ver con el transporte de lipoproteínas, vitaminas y colesterol dentro del sistema linfático y circulatorio. Esta se sintetiza principalmente en el hígado, pero se puede encontrar en otros tejidos como el cerebro, riñones y bazo. El sistema nervioso, células no neuronales, la astrogliia y microglia son los productores primarios de APOE, y son las neuronas las que preferentemente expresan el receptor para APOE. En el organismo humano se pueden encontrar tres isoformas de APOE y estas son: apoE ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4 denominadas así por sus diferentes alelos que son: ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4; respectivamente (Figura 18). Estas tres isoformas difieren únicamente en un aminoácido: (Hill, et. al., 2007)

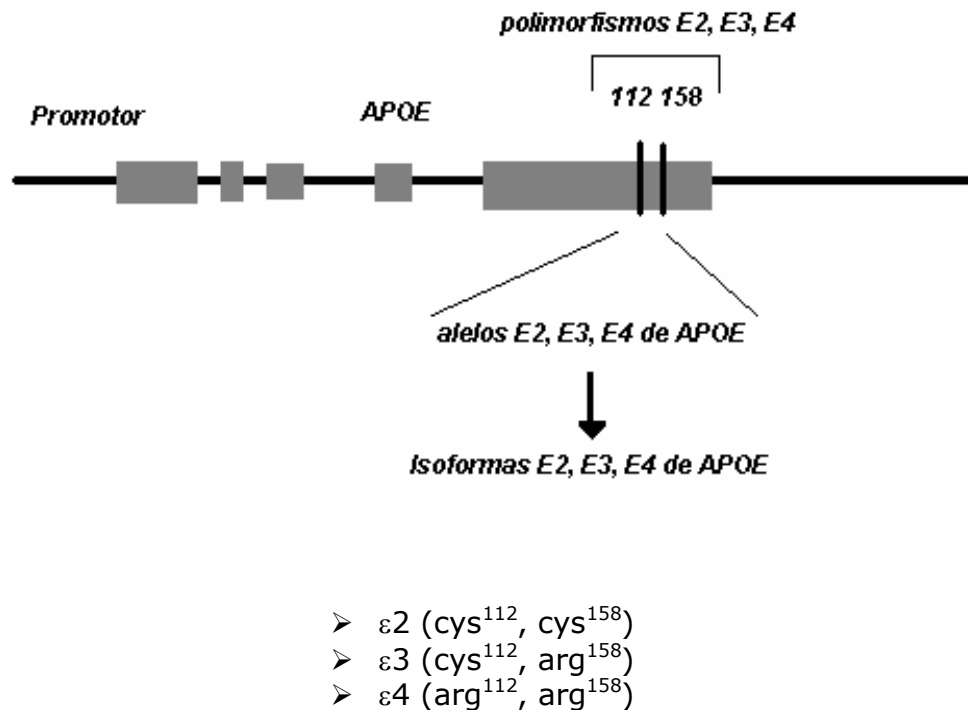


Figura 18. El gen de la apolipoproteína E. (Hill, 2007).

El alelo ϵ 4 del gen de la APOE es el factor de riesgo más aceptado para la presentación de la EA tardía pero el mecanismo por el cual actúa aun no está

bien claro (Liu, et. al., 2008). ApoE es el encargado del transporte del colesterol en el cerebro y es necesario para su homeostasis, debido a esto se ha establecido que existe una relación entre la edad de presentación y el que se presente el alelo $\epsilon 4$ (Jicha, et. al., 2008).

Existen varias hipótesis para explicar el mecanismo por el cual la APOE $\epsilon 4$ colabora con la patogénesis de la enfermedad uno de ellos es el propuesto por Uwe Beffert y cols.; ellos trabajaron induciendo lesiones en el cerebro de ratas. El modelo representa (Figura 19) la hipótesis del mecanismo de reciclaje del colesterol y los fosfolípidos en el hipocampo después de la inducción de lesiones en la corteza cerebral. Las lesiones en el entorno de la corteza cerebral causan degeneración de las terminales nerviosas en el hipocampo. Estas terminales nerviosas degeneradas inicialmente se internan y son degradadas por los astrocitos. El colesterol derivado de la degradación de las membranas de las terminales nerviosas (1) es utilizado como FC y se ensamblan en un complejo constituido por apoE/FC/lipoproteína, (2) o se convierte en CE para utilizarlo posteriormente. Los complejos (a) pueden ser exportados al medio extracelular, para atravesar barrera hematoencefálica y salir a circulación y/o (b) llegar a células neuronales que requieran lípidos. Los complejos de APOE son nuevamente captados (3) por la neuronas las cuales internan estos complejos a través de un receptor para apoE (LDL, LRP, etc.) y el colesterol liberado (4) es utilizado para la proliferación dendrítica y/o la remodelación sináptica. Al incrementarse los niveles de colesterol libre en las células conduce a una reducción de la síntesis de la enzima reductasa HMG-Coa (Uwe, et. al., 1998). Lo que se cree que sucede cuando se presenta el alelo $\epsilon 4$ es que el complejo apoE/FC/lipoproteína es muy fuerte lo cual evita que se libere el colesterol, debido a esto se acumula dentro de la célula y favorece la formación de los complejos patológicos de la enfermedad (Jicha, et. al., 2008; Zhou, et. al., 2008).

La relación de este gen con la EA está basada en varias observaciones importantes:

1. Estudios genéticos realizados en individuos con EA familiar de presentación tardía sugieren que existe una asociación entre la enfermedad y la región del cromosoma (Uwe, et. al., 1998).
2. En estudios de inmunoreacción se ha encontrado que APOE forma parte de las placas seniles y placas neurofibrilares, en pacientes con EA (Jicha, et. al., 2008).
3. En análisis de fluido cerebro espinal, se ha encontrado una asociación entre APOE y el péptido βA (Singh, et. al., 2006).
4. Diversos estudios revelan que al presentarse el alelo $\epsilon 4$ se considera un factor de riesgo para la presentación esporádica o tardía de la enfermedad (Devanand, et. al., 2008).

5. También se ha observado que pacientes que presentan el alelo $\epsilon 4$ responden pobremente a la terapia con colino miméticos (Horsburgh, et. al., 2000).
6. El alelo $\epsilon 4$ y una historia familiar de la EA son ambos factores de riesgo para la presentación de la enfermedad. Lo más interesante es que los niños que cuentan con estos dos factores muestran dificultades en el aprendizaje (Bloss, et. al., 2008).
7. También se relaciona la presencia del alelo y la edad con los efectos sobre la función cognitiva (Liu, et. al., 2008).

Por otro lado al alelo $\epsilon 3$, se le asocia como factor de riesgo intermedio; todo esto debido a que estudios *in vitro* demuestran que las isoformas $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, están relacionadas con la formación de una apoproteína que se une más fuertemente a las lipoproteínas, impidiendo así, que sean fácilmente liberadas estas después de ser interiorizadas por la célula, provocando la formación de placas neurofibrilares. También se ha observado que el alelo $\epsilon 2$ puede proteger contra la enfermedad aun en edades avanzadas o mínimo postergar su presentación temprana (Growdon, 2008).

Otro factor que sustenta la relación de APOE con la EA es el hecho de que el cerebro es el principal sitio de expresión para el ARNm para APOE en humanos, la transcripción de APOE está distribuida en varias regiones del cerebro, y puede ser localizada por hibridación insitu en los astrositos y microglia. Al realizar la hibridación se puede observar que APOE es sintetizada y secretada por células de la glia, particularmente por los astrositos, pero no por neuronas (Liu, et. al., 2008). En el sistema nervioso, la importancia de los polimorfismos de ApoE también se ha relacionado con la función de la plasticidad neuronal y con otras patologías que muestra la EA. Especialmente el alelo $\epsilon 4$, ya que este tiene un efecto importante en el desarrollo de la enfermedad, como; la extensión de la lesión de la célula neuronal, la actividad colinérgica, la acumulación de placas amiloides en el hipocampo y áreas corticales y la producción total del β amiloide y los depósitos amiloides en el cerebro de los sujetos con EA. Los portadores del alelo $\epsilon 4$ muestran una pobre remodelación sináptica y un defecto en la plasticidad de las áreas vulnerables del cerebro. Actualmente, el papel de ApoE en la manutención de la integridad sináptica y la plasticidad es un tema central en la fisiología del cerebro ya que la pérdida de esta habilidad se ha encontrado principalmente en sujetos portadores del alelo $\epsilon 4$. Aunque cabe señalar, que el efecto del genotipo de ApoE en la plasticidad sináptica, no es únicamente en la EA; también se da en la enfermedad de Parkinson, en la esclerosis lateral amiotrópica, en la demencia boxer, y después de ciertos traumatismos cerebrales (Ezquerria, et. al., 2008).

En concreto se ha encontrado que en personas con Alzheimer existe un incremento en los niveles de ARNm de APOE $\epsilon 4$ comparado con los niveles presentados en personas sanas. Esta diferencia en la expresión alélica del gen de APOE en la EA sugiere que en adición con el efecto cualitativo de sus

polimorfismos, la expresión cuantitativa puede producir un factor de riesgo genético para la presentación de la EA (Alachkar, et. al., 2008).

El gen de la APOE se localiza en el cromosoma 19q13.2 y es altamente polimórfico (Figura 20). Este gen tiene una longitud de 3.7 kb y contiene 4 exones. Está integrado a un gen familiar que contiene los genes para apo C-I, C-I' y C-II.

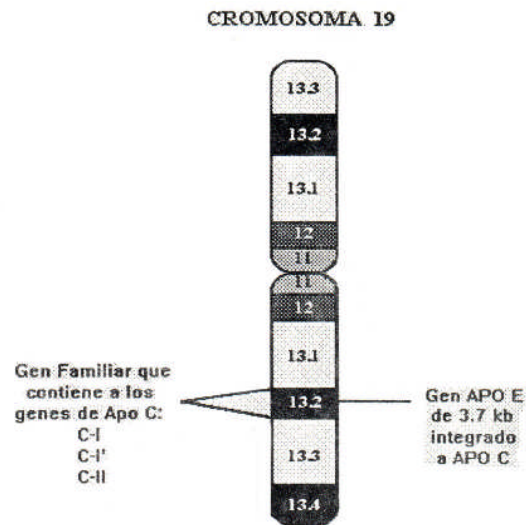


Figura 20. Cromosoma 19 con bandas G en el cual se muestra la localización del gen de APO E y APO C (Alachkar, et. al., 2008).

De cualquier modo APOE $\epsilon 4$ no es ni necesario, ni suficiente para el desarrollo de la demencia, ya que pueden existir otros factores de riesgo genéticos y que estos solos o en conjunto con APOE $\epsilon 4$ pueden provocar el desarrollo de la enfermedad (McNamara et. al., 1998).

Se ha visto que el estrés oxidativo también contribuye de forma importante en el desarrollo de la enfermedad y que además se relaciona con la acumulación de APOE (Ghania et. al., 2008). La apolipoproteína E es una molécula multifuncional que es activada durante el desarrollo, mantenimiento y daño del cerebro. El alelo $\epsilon 4$ es reconocido como factor de riesgo para la beta amiloidosis, pero el mecanismo responsable no está claro. La asociación de la pérdida de memoria y el genotipo APOE $\epsilon 4$ puede ser encontrado en poblaciones de mediana edad y se presenta particularmente en mujeres post menopáusicas. Algunos estudios muestran que el aprendizaje y las deficiencias en la memoria se presentan en mayor proporción en la presencia del alelo (Bour et. al., 2008).

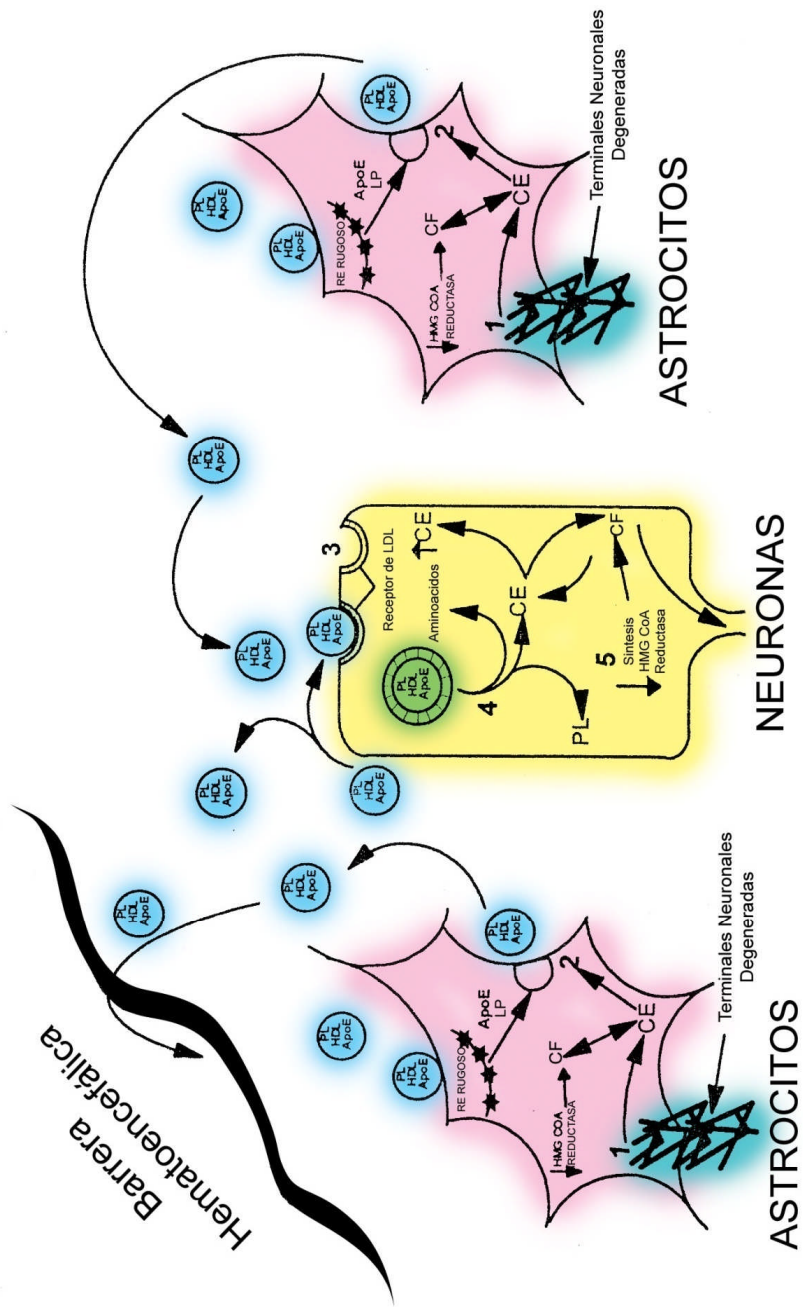


Figura 19. El CE: colesterol esterificado, ER: retículo endoplásmico, HDL: lipoproteína de alta densidad, PL: fosfolípidos (Uwe 1998).

2. JUSTIFICACIÓN.

La Enfermedad de Alzheimer o Demencia Senil, provoca que el enfermo se pierda en lugares conocidos, olvide nombres de familiares cercanos, se olvide de cómo vestirse, cómo leer o cómo abrir una puerta; éstos son algunos de los síntomas más comunes. (Florence, et al., 2001). En la actualidad la enfermedad de Alzheimer es considerada el tipo de demencia más importante a nivel mundial, ya que la presentación de esta enfermedad se ha incrementado, esto atribuido a diversas causas, como pueden ser: el que la población pueda alcanzar una mayor longevidad gracias a los avances en los diferentes campos de la medicina; el estrés y la contaminación, además de la aparición de nuevas enfermedades que crean importantes estragos en la salud física y mental, sin olvidar la predisposición genética que pueda tener cada individuo a esta enfermedad (Pareja, et. al., 2008; Di Carlo, et. al., 2002). Se tiene bien documentado que a nivel genético las personas con historia familiar de Alzheimer llegan a ser más susceptibles de padecerla, aunque se ha visto que es necesario tener un factor detonante (Práctico, 2008).

La enfermedad de Alzheimer es una de los desórdenes neurodegenerativos más frecuentes con etiologías heterogéneas incluyendo factores genéticos. Muchos de los casos familiares de Alzheimer de presentación temprana pueden ser explicadas por mutaciones en el gen de la Presinilina 1 (PS-1) y el gen del precursor de la proteína β amiloide (APP) (Fraser, et. al., 2000). Por otro lado, la presentación temprana <65 años y tardía ≥ 65 años de la etiología únicamente puede ser parcialmente explicada por el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (Bloss, et. al., 2008). Existen en general tres diferentes alelos de este gen en la población que son $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ y la presencia de el alelo $\epsilon 4$ se relaciona con el incremento del riesgo a padecer la enfermedad, por el contrario se dice que el alelo $\epsilon 2$ confiere protección para no presentar la enfermedad o por lo menos retardar su aparición. (Liu, et. al., 2008). Es precisamente en esto en lo que se basa este trabajo ya que se pretende realizar la genotipificación del gen de APOE en individuos sanos y con demencia tipo Alzheimer, para establecer si existe relación entre los polimorfismos y la enfermedad en una muestra de la población mexicana ya que no hay que olvidar que la diversidad genética se relaciona con la diversidad de la raza.

3. Hipótesis:

La presencia de los alelos ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 de ApoE en pacientes con demencia tipo Alzheimer e individuos clínicamente sanos, se cree que están asociados con el riesgo para desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

3.1. Objetivo General:

Determinar las frecuencias alélicas del gen de la apolipoproteína E (Apo E) en muestras de individuos sanos y enfermos con probable demencia tipo Alzheimer.

3.2. Objetivos Particulares:

1. Obtener el material genético (DNA) de individuos sanos y con probable demencia tipo Alzheimer mediante la técnica de extracción con Fenol / Cloroformo.
2. Amplificar el gen de ApoE del DNA por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
3. Establecer el genotipo de ApoE en ambos grupos de individuos mediante el empleo de la técnica de Restricción con la enzima HhaI o CfoI.
4. Estimar la frecuencia con la que se presentan los alelos ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 , y determinar si este último representa un factor de riesgo para la aparición de la enfermedad.
5. Realizar el análisis estadístico para determinar si existe significancia en la relación de la frecuencia alélica y genotípica con el riesgo a desarrollar la enfermedad y su relación con la edad.

4. METODOLOGÍA

POBLACIÓN DE ESTUDIO: La muestra total fue de 92 individuos de los cuales 43 fueron individuos sin demencia y 49 individuos con probable EA; incluyendo hombres y mujeres. El parámetro de edad en ambos grupos fue desde 49 años hasta 92 años. Todos ellos fueron captados durante un periodo de 1 año y medio en consulta externa de neurología y geriatría del Hospital Central Militar y Especialidades Médicas. Los criterios de inclusión y exclusión fueron: historial médico completo incluyendo historia con EA, diagnóstico de salud mental o demencia de cada uno de los integrantes de nuestra muestra para lo cual fue necesario realizar batería de pruebas neuropsicológicas incluyendo el Minimental o MMSE y estudios de gabinete (resonancia magnética, tomografía axial computarizada), se realizó una química sanguínea completa en la cual se cuantificó el colesterol total, lípidos de alta y baja densidad y triglicéridos, todo evaluado por un equipo multidisciplinario y dando seguimiento a cada uno de los casos. Para realizar el estudio de genotipificación a los individuos se les tomó una muestra de sangre total; previa elaboración de hoja de consentimiento informado.

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO: Se utilizó un método rápido de alta calidad para la extracción de ADN a partir de sangre, el cual se basa en la obtención de un extracto de ADN directamente de linfocitos obtenidos de una muestra de sangre completa, por medio de una desnaturalización con una subsiguiente precipitación selectiva de ADN, que permite obtener un extracto de ADN cuantitativo y reproducible (Watson, et. al., 2005; Thomson, et. al., 2004).

PROCEDIMIENTO:

Extraer la muestra de sangre periférica en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA (7 ml de muestra), posteriormente centrifugar los tubos a 1000 rpm durante 10 min. Después separar la capa logística que es la que contiene mayor cantidad de leucocitos utilizando tubos Eppendorf. Etiquetar y almacenar a -74° C. Posteriormente descongelar las muestras y la proteinasa K (20 μ g/ml) a temperatura ambiente, en este lapso de tiempo preparar el baño maría a 65° C y una vez descongeladas las muestras se toman 200 μ l de la muestra y después adicionar 600 μ l de Buffer de extracción (8% DTAB, 1.5M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.6, 50 mM EDTA), mezclando por 3 min.

Adicionar 15 μ l de proteinasa K (20 μ g/ml) y agitar suavemente. Incubar por 30 min. a 65° C. En este lapso preparar otros tubos. Después de finalizada la incubación adicionar 700 μ l de una mezcla de fenol – cloroformo – alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y mezclar perfectamente por 3 min. Posteriormente centrifugar por 5 min. a 2500 rpm para posteriormente separar con la ayuda de una micropipeta la mayor cantidad de fase acuosa cuidadosamente. Después agregar 500 μ l de una solución de cloroformo isoamílico (V/V), y mezclar perfectamente por 3 min.

Centrifugar por 5 min. a 2500 rpm y preparar nuevamente otros tubos para colocar en ellos la fase acuosa. Adicionar (V/V) 500 μ l de etanol absoluto y 20 μ l de NaCl 0.2M y mezclar cuidadosamente hasta que se precipite el ADN. Centrifugar por 5 min. a 10,000 rpm. Decantar cuidadosamente para no desechar el ADN. Lavar 3 veces con 500 μ l de etanol al 70%, con centrifugaciones de 10,000 rpm por 5 min entre cada lavado. Secar para eliminar el etanol y resuspender en 100 μ l de agua estéril, hasta homogenizar completamente. Conservar la muestra a - 21°C.

Para comprobar que se obtuvo el ADN correr un gel de agarosa al 1% para lo cual se pesa en un matraz Erlenmeyer 0.2 g de agarosa y disolver en 20 ml de TBE al 0.5%, agregar 0.5 μ l de Bromuro de etidio. Decantar el contenido en una bandeja para electroforesis, colocar un peine en la parte superior del gel y esperar a que solidifique. Luego colocar 5 μ l de la muestra de ADN en cada poso y colocar un control positivo (una muestra de ADN ya identificada previamente), a 90 volts por 40 min.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): Se fundamenta en la amplificación enzimática *in vitro* de un fragmento de ADN y/o RNA imitando al fenómeno de replicación. Requiere el conocimiento de las secuencias que flanquean la región a amplificar. Se producen oligonucleótidos complementarios de estas secuencias mediante síntesis química automatizada y se utilizan como cebadores en una serie específica de reacciones catalizadas por la ADN polimerasa (Mathews, et. al., 2000).

PROCEDIMIENTO: Para la realización de la PCR fue necesario preparar una mezcla de reacción de la siguiente manera:

Tabla 5. Reactivos con sus respectivas concentraciones y volúmenes, para la mezcla de PCR (Silva, et. al., 2002).

REACTIVO	CONC. SOL. STOCK	CONC. REQUERIDA	VOLUMEN EN μl
MgCl₂	50 mM	0.75 mM	0.75
Buffer	10 X	1 X	2.5
DNTP´s	100 mM	200 mM c/u	2.5
DMSO	100%	10%	2.5
PRIMER F	10 μ M	1 μ M	2.5
PRIMER R	10 μ M	1 μ M	2.5
Taq. POL.	5 U/ul	0.02 U/ul	0.1
ADN		250 ng	4
H₂O	Ajustar dependiendo	del volumen	7.65

La secuencia de los oligonucleótidos a trabajar fue (Silva, et. al., 2002):

PRIMER F

5´ TCC AAG GAG CTG CAG GGG CA 3´ (TM de 78)

PRIMER R

5´ ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC 3´ (TM de 98)

La concentración de la solución de ADN que se trabajo fue de 50 ng/ µl

Programa de ciclos para amplificación del ADN:

- 1) Desnaturalización a 96°C durante 2 min. y 94°C durante 3 min.
- 2) 45 ciclos con tres temperaturas:
 - a) 94°C por 30 seg. (Desnaturalización).
 - b) 65°C por 20 seg. (Hibridación).
 - c) 72°C por 30 seg. (Extensión).
- 3) Se finalizo la reacción mediante el paso de extensión a 72°C por 5 min.

Para comprobar si se llevó a cabo la amplificación, se corrió 5 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 2.5% (70voltios/ 20 min.). Se obtuvo un amplicón de 227 pb el cual contenía los sitios polimórficos de ApoE.

Digestión del producto de PCR: Se fundamenta en la realización de uno o varios cortes dentro de un segmento específico de ADN, mediante el uso de una enzima de restricción. Las cuales son obtenidas de bacterias que contienen enzimas del tipo de las endonucleasas de restricción y las metilasas que reconocen secuencias específicas en el ADN (Aranega et. al., 2002).

PROCEDIMIENTO: Del producto de PCR se tomó 10µl y se adicionaron 3 µl de Buffer 1, 16 µl de agua y 12 U (1 µl) de la enzima de restricción Cfol (el corte para esta enzima es GCGC) y se incubó a 37°C toda la noche. Se concentro la muestra en un volumen final de 10 µl. Se corrió 5 µl de la digestión en un gel de agarosa 1000 al 3%. Para lo cual se pesó 0.6 g de agarosa y se disolvió en 20 ml de TBE al 0.5% (80 voltios/40 min). Se corrió junto con un marcador de peso molecular de 25 pb. Finalmente se identificaron los alelos de la apoE según las siguientes tablas:

Tabla 6. Bandas para cada alelo (Silva, et. al., 2002).

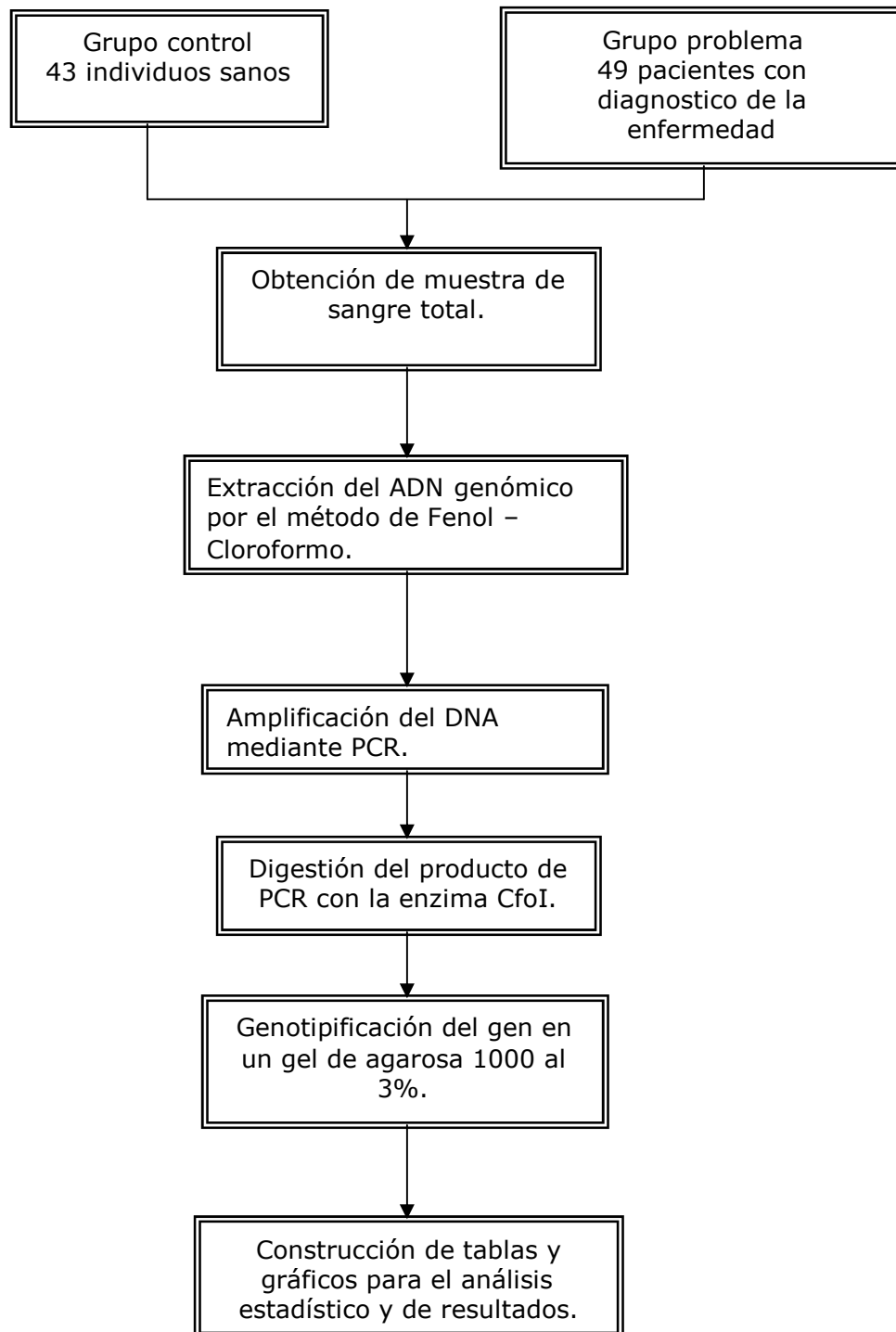
ALELOS	BANDAS ESPERADAS (pb)					
ε 2	91	81			21	18
ε 3	91		48	33	21	18 16
ε 4			72	48	33	21 19 18 16

Tabla 7. Bandas para cada genotipo (Silva, et. al., 2002).

GENOTIPOS	BANDAS ESPERADAS (pb)							
$\epsilon 2/\epsilon 2$	91	81			21		18	16
$\epsilon 2/\epsilon 3$	91	81	48	33	21		18	16
$\epsilon 3/\epsilon 3$	91		48	33	21		18	16
$\epsilon 3/\epsilon 4$	91		72	48	33	21	19	18
$\epsilon 4/\epsilon 4$			72	48	33	21	19	18
$\epsilon 4/\epsilon 2$	91	81	72	48	33	21	19	18

Estadística: Una vez identificado cada uno de los genotipos, se procedió a la realización de tablas y gráficos para el análisis estadístico (los programas estadísticos se utilizaron fueron Sigmaplot y Sigmastat) mediante la técnica de OR y ANOVA. Posteriormente se elaboro el análisis de resultados y conclusiones.

5. DIAGRAMA DE FLUJO.



6. RESULTADOS.

✱ Se le aplicó el método de inmunofluorescencia indirecta para detectar la presencia de anticuerpos contra el antígeno de la bacteria *S. flexneri* en el suero.

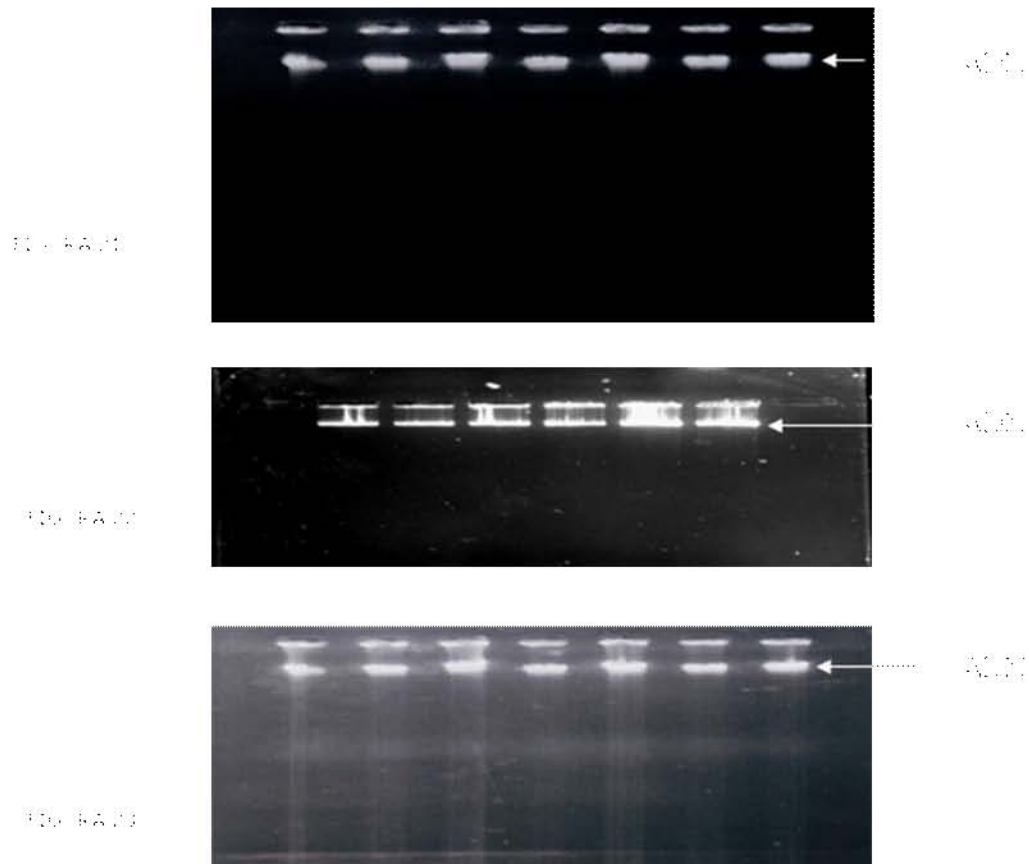


Figura 6. Inmunofluorescencia indirecta para la

detección de anticuerpos contra el antígeno de *S. flexneri* en el suero obtenido de los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

✦ La siguiente figura muestra los amplificados que se obtuvieron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

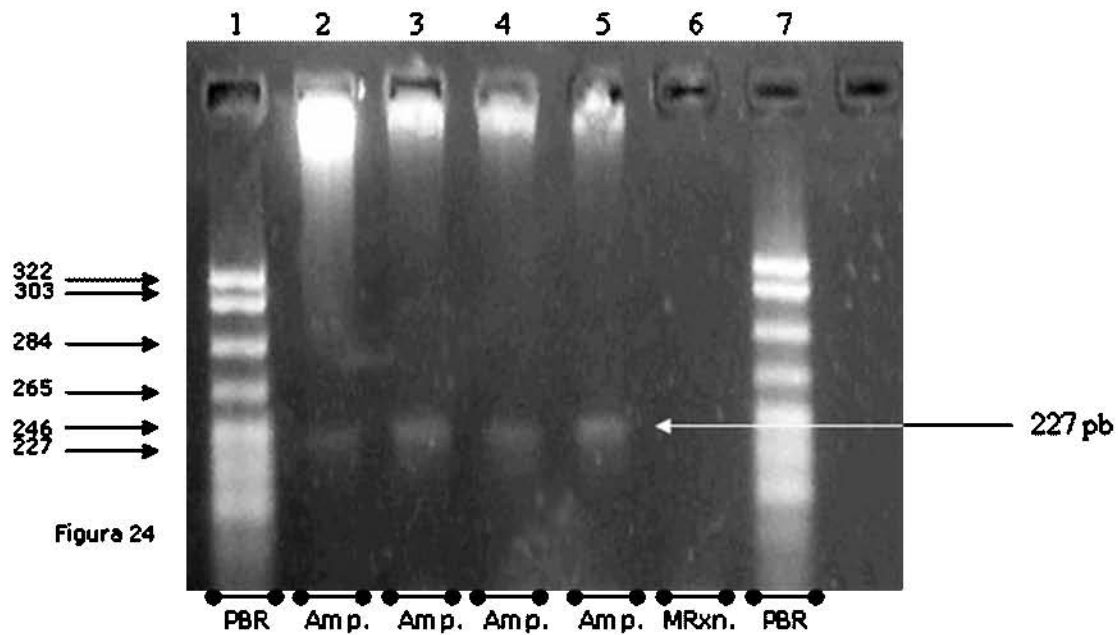


Figura 24

Figura 24. Gel de agarosa al 2.5% .

El carril 1 y 7 contienen m arcador de peso molecular de 322 pb, los carriles 2, 3, 4 y 5 contienen el producto de reacción después de concluida la PCR; como se observa el amplificado (Amp) es de 227 pb. El carril 6 contiene la mezcla de reacción (MRxn.) la cual se utilizó para verificar que no exista contaminación de ningún tipo.

■ La siguiente figura muestra genotipos obtenidos después de realizada la digestión del producto de PCR con la enzima CfoI

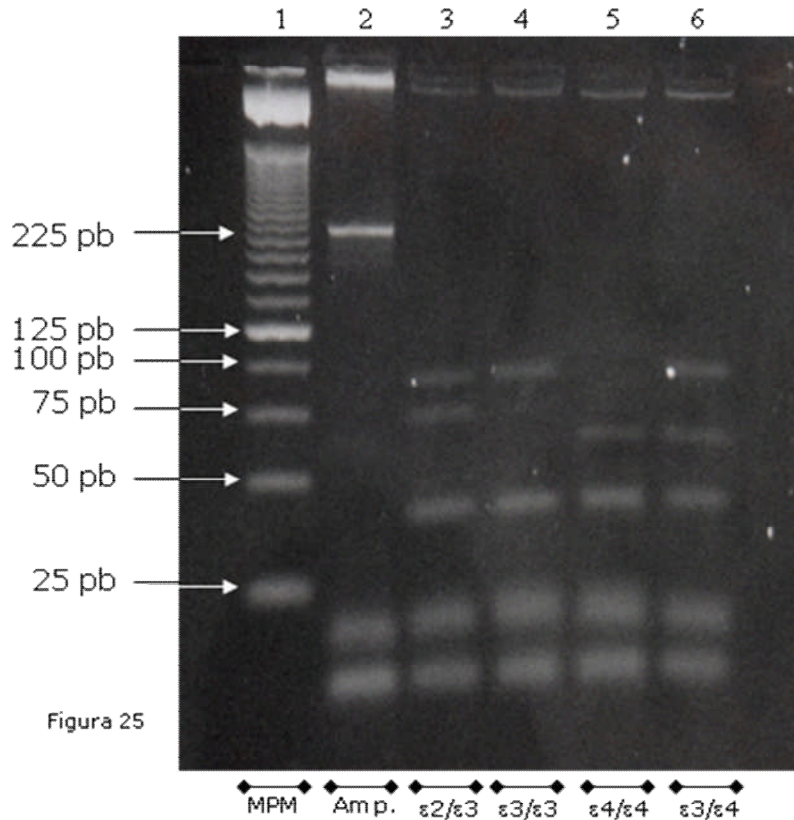


Figura 25. Gel de agarosa 1000 al 3% . El carril 1 contiene el Marcador de Peso Molecular de 25pb(MPM), el carril 2 muestra el amplificado (Amp) de 227pb. Los carriles 3, 4, 5 y 6 contienen los productos de digestión y en base a el patrón de bandeo presente en cada uno de ellos se establece el genotipo (véase tablas 6 y 7). En la figura 24 se muestran únicamente los cuatro genotipos encontrados durante la experimentación.

- El patrón de bandeo del carril 3 corresponde a un genotipo E2/E3 por que contiene las bandas 91,81,48,21,18,16.
- El patrón de bandeo del carril 4 corresponde a un genotipo E3/E3 por que contiene las bandas 91,48,21,19,18,16.
- El patrón de bandeo del carril 5 corresponde a un genotipo E4/E4 por que contiene las bandas 72,48,21,19,18,16.
- El patrón de bandeo del carril 6 corresponde a un genotipo E3/E4 por que contiene las bandas 91,72,48,21,19,18,16.

Las tablas 8, 9 y 10 muestran la lista de los individuos pertenecientes a cada grupo.

TABLA 8. Se muestra el grupo de hombres con posible demencia tipo Alzheimer (casos) y el de hombres control. La tabla contiene la edad de cada uno, así como el genotipo obtenido para el gen de ApoE. Como se observa ambos grupos se encuentran relacionados por edades con un intervalo de +/- 3 años.

SEXO (CASOS)	EDAD	GENOTIPO	SEXO (CONTROLES)	EDAD	GENOTIPO
		O			O
Masculino	80 años	E2/E3	Masculino	78 años	E3/E3
Masculino	49 años	E4/E4			
Masculino	55 años	E2/E3	Masculino	57 años	E2/E3
Masculino	65 años	E3/E3	Masculino	66 años	E3/E3
Masculino	49 años	E4/E4			
Masculino	70 años	E2/E3	Masculino	67 años	E3/E3
Masculino	72 años	E2/E3	Masculino	69 años	E3/E3
Masculino	77 años	E3/E3	Masculino	74 años	E3/E3
Masculino	73 años	E3/E3	Masculino	72 años	E2/E3
Masculino	66 años	E3/E3	Masculino	66 años	E3/E3
Masculino	71 años	E2/E3	Masculino	70 años	E3/E3
Masculino	70 años	E3/E3	Masculino	70 años	E3/E3
Masculino	92 años	E3/E3	Masculino	90 años	E3/E4

TABLA 9. En esta tabla se enlistan a mujeres y hombres con posible demencia tipo Alzheimer (casos) que no se incluyeron en las tablas 6 y 7 por no contar con el dato de edad, pero que sí se trabajaron para la obtención del genotipo por lo que se analizarán estadísticamente.

SEXO (CASOS)	GENOTIPO	HOMBRES (CASOS)	GENOTIPO
Femenino	E3/E4	Masculino	E3/E4
Femenino	E3/E3	Masculino	E2/E3
Femenino	E4/E4	Masculino	E2/E3
Femenino	E2/E3		
Femenino	E3/E3		

TABLA 10. Se muestra el grupo de mujeres con posible demencia tipo Alzheimer (casos) y el de mujeres control. La tabla contiene la edad de cada una, así como el genotipo obtenido para el gen de ApoE. Como se observa ambos grupos se encuentran relacionados por edades con un intervalo de +/- 3 años.

SEXO (CASOS)	EDAD	GENOTIPO	SEXO (CONTROLES)	EDAD	GENOTIPO
Femenino	57 años	E3/E3	Femenino	56 años	E3/E3
Femenino	56 años	E2/E3	Femenino	56 años	E2/E3
Femenino	71 años	E2/E3	Femenino	71 años	E3/E3
Femenino	80 años	E2/E3	Femenino	81 años	E3/E3
Femenino	61 años	E3/E3	Femenino	63 años	E3/E3
Femenino	69 años	E3/E4	Femenino	67 años	E3/E4
Femenino	72 años	E3/E3	Femenino	72 años	E3/E3
Femenino	88 años	E3/E3	Femenino	87 años	E2/E3
Femenino	59 años	E3/E3	Femenino	61 años	E3/E3
			Femenino	52 años	E3/E3
Femenino	65 años	E3/E4	Femenino	65 años	E3/E3
Femenino	70 años	E3/E3	Femenino	70 años	E3/E3
Femenino	55 años	E3/E3	Femenino	53 años	E3/E3
			Femenino	51 años	E3/E3
Femenino	77 años	E3/E3	Femenino	77 años	E3/E3
			Femenino	52 años	E3/E3
			Femenino	49 años	E3/E3
Femenino	72 años	E3/E3	Femenino	72 años	E3/E3
Femenino	70 años	E3/E3	Femenino	73 años	E4/E4
Femenino	86 años	E2/E3	Femenino	86 años	E3/E3
Femenino	82 años	E3/E3	Femenino	83 años	E3/E3
Femenino	81 años	E3/E4	Femenino	80 años	E3/E4
Femenino	87 años	E3/E3	Femenino	90 años	E3/E3
Femenino	80 años	E3/E3	Femenino	79 años	E3/E4
Femenino	88 años	E3/E3	Femenino	90 años	E3/E3
Femenino	82 años	E3/E4	Femenino	79 años	E3/E3
Femenino	68 años	E3/E3	Femenino	66 años	E3/E3
Femenino	77 años	E3/E4	Femenino	78 años	E3/E4
Femenino	62 años	E3/E4	Femenino	61 años	E3/E3
Femenino	90 años	E3/E3	Femenino	90 años	E3/E3
Femenino	74 años	E3/E4	Femenino	74 años	E3/E4
Femenino	76 años	E3/E3	Femenino	76 años	E3/E3

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas que se encontraron en los individuos sanos e individuos con demencia tipo Alzheimer. Para el cálculo del porcentaje de los genotipos encontrados en cada uno de los grupos evaluados, se tomo para los casos 49 individuos y para los controles 43 individuos como el 100 % respectivamente. En el caso de la frecuencia alélica se sumaron los individuos que presentan cada alelo de forma individual y se calculo el porcentaje es por esto que si se suma el por ciento, este excede al 100%.

GENOTIPO	CASOS	CONTROLES	ALELO	CASOS	CONTROLES
$\epsilon 2/\epsilon 3$	12 (24.49%)	4 (9.3%)	$\epsilon 2$	12 (24.49%)	4 (8.3%)
$\epsilon 3/\epsilon 3$	25 (51.02%)	32 (74.42%)	$\epsilon 3$	46 (83.88%)	42 (97.67%)
$\epsilon 3/\epsilon 4$	9 (18.37%)	6 (13.95%)	$\epsilon 4$	12 (24.49%)	7 (16.28%)
$\epsilon 4/\epsilon 4$	3 (6.12%)	1 (2.33%)			
TOTAL	49 (100%)	43 (100%)			

FRECUENCIAS PARA CADA GENOTIPO DE APOE ENCONTRADO EN AMBOS GRUPOS.

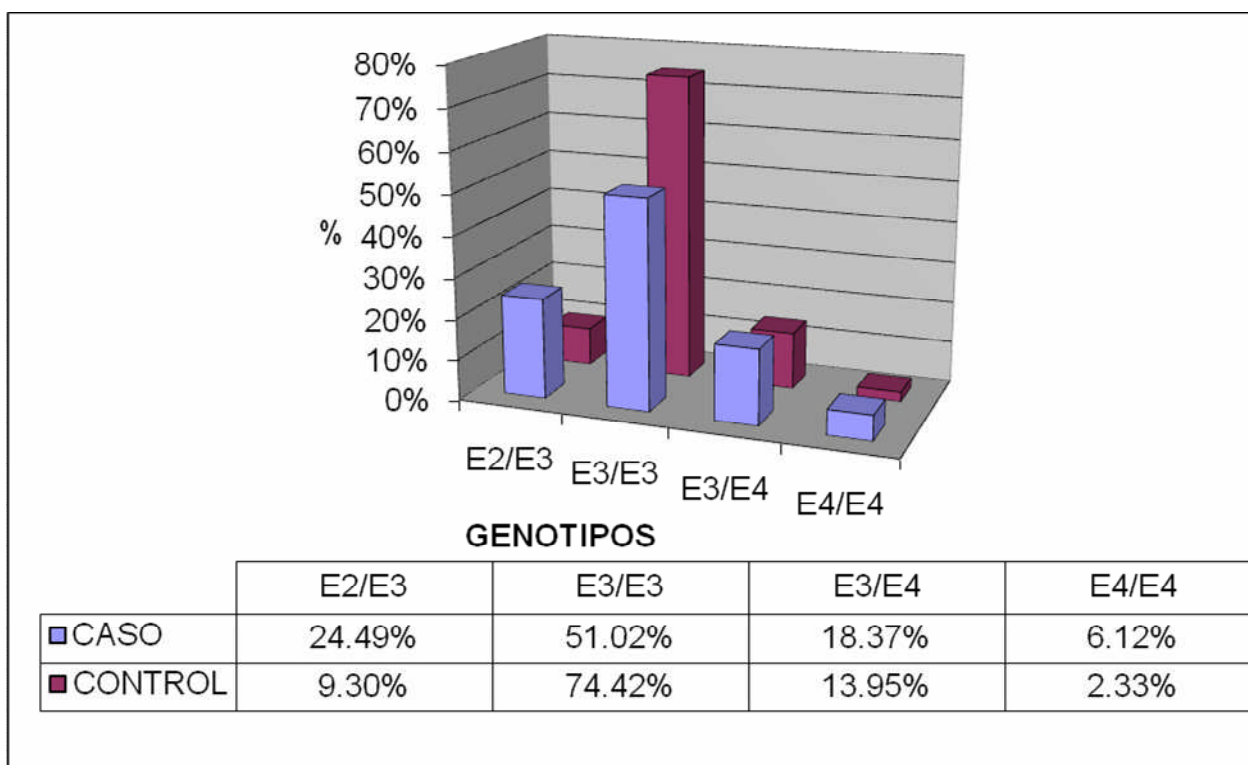


Figura 26. Frecuencia genotípica de ApoE en individuos normales y en el grupo con demencia tipo Alzheimer (Véase tabla 11).

FRECUENCIAS ALELICAS DE APOE ENCONTRADO EN AMBOS GRUPOS.

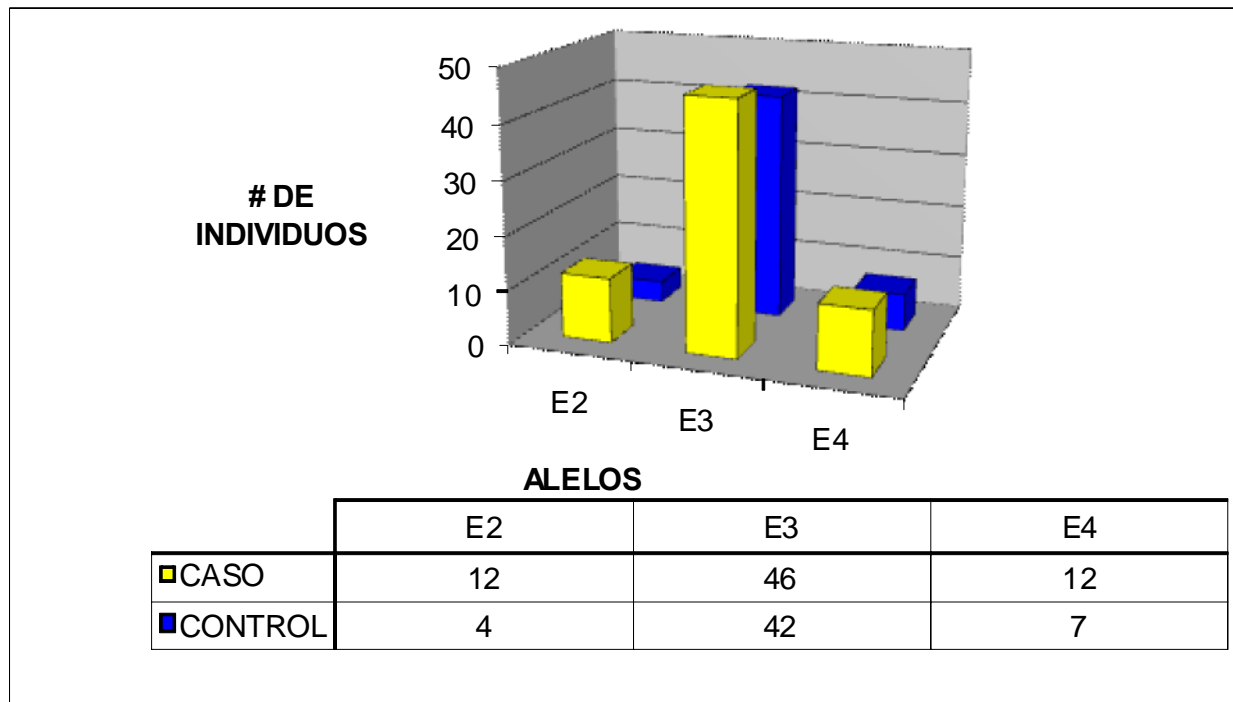


Figura 27. Frecuencia alélica de ApoE en individuos sanos e individuos con probable demencia tipo Alzheimer (Véase tabla 11).

6.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.

De manera general se encontró que de los 92 individuos (100%) 49 de ellos (53.26%) fueron individuos con probable EA de los cuales 16 (32,65%) fueron hombres y 33 (67.35%) mujeres. Por otro lado 43 de los individuos (56.74%) formaron parte del grupo control (pacientes clínicamente sanos) de los cuales 11 (25.58%) fueron hombres y 32 (74.42%) mujeres.

El genotipo con más frecuencia en ambos grupos fue el $\epsilon 3/\epsilon 3$. El alelo $\epsilon 4$ se encuentra en su forma homocigota y heterocigota en ambos grupos pero se encuentra en mayor porcentaje en los casos (véase tabla 11 y las figuras 26 y 27).

6.2. PRUEBA EXACTA DE FISHER.

Ho: La presencia del alelo $\epsilon 4$ no es factor de riesgo para el desarrollo de la demencia tipo Alzheimer.

Tabla 12. Número de individuos con presencia o ausencia del alelo $\epsilon 4$, en ambos grupos, ya sea de forma homocigota o heterocigota.

	PRESENTAN	AUSENCIA	TOTAL
	$\epsilon 4$	$\epsilon 4$	
CASOS	12	37	49
CONTROLES	7	36	43
TOTAL	19	73	92

(P=1)

SUJETOS	12	7	
37	1	0	VALOR
	0.5	0.5	VALOR ESPERADO
	100	0	% FILA
	100	0	% COLUMNA
	50	0	% TOTAL
36	0	1	VALOR
	0.5	0.5	VALOR ESPERADO
	0	100	% FILA
	0	100	% COLUMNA
	0	50	% TOTAL

La proporción de las observaciones en las diferentes categorías que define la tabla de contingencia no es significativamente diferente del suceso esperado por el azar. Por lo que H_0 se acepta.

Nota: El cálculo de esta prueba se hizo en el programa SigmaStat 2.03

6.3. CALCULOS DEL "ODDS RATIO" (OR)

Tabla 13. Proporción entre el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ y el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$.

	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
CASO	12	3
CONTROL	4	1

$$OR = (12 \times 1) / (3 \times 4) = 1$$

Tabla 14. Proporción entre el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ y el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$.

	E3/E3	E3/E4
CASO	25	9
CONTROL	32	6

$$OR = (25 \times 6) / (9 \times 32) = 0.521$$

Tabla 15. Proporción entre el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ y el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$.

	E3/E4	E4/E4
CASO	9	3
CONTROL	6	1

$$OR=(9 \times 1)/(3 \times 6)=0.5$$

Tabla 16. Proporción entre mujeres y hombres.

	MUJERES	HOMBRES
CASO	33	16
CONTROL	32	11

$$OR=(33 \times 11)/(16 \times 32)=0.71$$

6.4.

CALCULO DE LA ANOVA.

Tabla 17. Frecuencias de cada genotipo que se presentan en los diferentes intervalos de edad, únicamente en el grupo de individuos con demencia tipo Alzheimer.

EDADES	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 3/\epsilon 4$	$\epsilon 4/\epsilon 4$
45 - 55	1	1	0	2
56 - 65	1	4	2	0
66 - 75	4	7	3	0
76 - 85	2	5	3	0
86 - 95	1	5	0	0

Ho: La frecuencia con la que se presentan cada uno de los genotipos en los diferentes intervalos de edad es independiente.

Hi: La frecuencia con la que se presentan cada uno de los genotipos en los diferentes intervalos de edad no es independiente.

GRUPOS	N	VALORES PERDIDOS	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR	ERROR ESTANDAR DE LA MEDIA
1	5	0	1.800	1.304	0.583
2	5	0	4.400	2.191	0.980
3	5	0	1.600	1.517	0.678
4	5	0	0.400	0.894	0.400

FUENTE	gl	SC	Varianza	F	P
ENTRE GRUPOS	3	42.550	14.183	5.910	0.007
Residual	16	38.400	2.400		
Total	19	80.950			

La diferencia en los valores de la media entre los grupos tratados es mayor al que debe esperarse, por lo que se da una diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.007$)

Con un $\alpha = 0.05$: 0.828

Como p es $>$ a 0.05 se rechaza la H_0 , por lo tanto, la frecuencia con la que se presentan cada uno de los genotipos en los diferentes intervalos de edad no es independiente.

Procedimiento de comparaciones múltiples por parejas (Prueba de Tuckey):

COMPARACIÓN	DIFERENCIAS DE LAS MEDIAS	P	Q	P	$P < 0.050$
Col 2 vs. Col 4	4.000	4	5.774	0.004	Si
Col 2 vs. Col 3	2.800	4	4.041	0.050	No
Col 2 vs. Col 1	2.600	4	3.753	0.074	*
Col 1 vs. Col 4	1.400	4	2.021	0.501	No
Col 1 vs. Col 3	0.200	4	0.289	0.997	*
Col 3 vs. Col 4	1.200	4	1.732	0.621	*

El * significa que las diferencias entre las medias no son significativas.

7. DISCUSIÓN.

Como se observan en las figuras 21, 22 y 23 la extracción de ADN con el método de fenol:cloroformo permitió obtener un ADN integro y en buena cantidad, ya que como se puede apreciar en los geles, las bandas se visualizan uniformes y sin barridos. Es conveniente que el ADN aparezca en cada carril del gel como un barrido homogéneo, sin que se observen flecos ni bandas que puedan indicar la presencia de degradación (Aranega, et. al., 2002).

La PCR es una técnica capaz de generar "*in vitro*" un gran número de copias de un fragmento de ADN original (del orden de 10^6 copias), lo que la convierte en una herramienta extraordinariamente útil en el ámbito de la biología molecular. Todo esto mediante replicaciones sucesivas de la secuencia de ADN que nos interesa. Este proceso requiere el uso de dos cebadores nucleotídicos o "primers" complementarios de las secuencias situadas en los extremos del fragmento de ADN que queremos amplificar (Watson, et. al., 2005). La figura 24 muestra un gel que contiene el amplificado de 227 pb correspondiente al gen de APOE, por lo que las condiciones para la realización de la PCR, así como los "primers" utilizados son los indicados.

Las endonucleasas de restricción tipo II producen ruptura dentro o muy cerca de la secuencia de reconocimiento, lo que hace que generen fragmentos de un tamaño definido. Ello las convierte en herramientas imprescindibles en las técnicas de biología molecular (Watson, et. al., 2005). Como se observa en la Figura 25 la digestión hizo posible la genotipificación de cada una de las muestras trabajadas. La genotipificación se elaboro en base al patrón de bandeo obtenido después del uso de las endonucleasas Cfo I, utilizando la tabla 7.

En la población total se encontró que la frecuencia alélica es de 95.65% para el alelo $\epsilon 3$, 20.65% para el alelo $\epsilon 4$ y de 17.4% para el alelo $\epsilon 2$. El orden de frecuencia coincide con el que se encontró para una muestra de 72 individuos del Hospital Central Militar (Silva, et. al., 2002).

Como se observa en la Tabla 10 el alelo más común en el grupo control es $\epsilon 3$ (97.67%), $\epsilon 4$ (16.28%) y $\epsilon 2$ (8.3%) en sus formas homocigota y heterocigota y en el grupo con EA el alelo con mayor frecuencia es $\epsilon 3$ (83.88%) en sus formas homocigota y heterocigota, y la frecuencia del alelo $\epsilon 2$ (24.49%) es la misma que la del $\epsilon 4$ (24.49%). Las frecuencias alélicas en el grupo control coinciden con las frecuencias alélica para la población mexicana sana que se reportan son: $\epsilon 3$ (90.9)< $\epsilon 4$ (6.7)< $\epsilon 2$ (2.4) (Guerrero, 1997). Se encontraron 4 diferentes genotipos para APOE y sus frecuencias fueron: (véase Tabla 11 y Figura 26)

✦ En el grupo control: $\epsilon 3/\epsilon 3$ con 74.42%, $\epsilon 3/\epsilon 4$ con 13.95%, $\epsilon 2/\epsilon 3$ con 9.3% y $\epsilon 4/\epsilon 4$ con 2.33%.

✦ En el grupo con EA: ϵ_3/ϵ_3 con 51.02%, ϵ_2/ϵ_3 con 24.49%, el ϵ_3/ϵ_4 con 18.37% y el ϵ_4/ϵ_4 con 6.12%.

Por otro lado, se observa un aumento de frecuencia para ϵ_4 en sus formas homocigota y heterocigota en el grupo con DTA respecto al grupo control. Lo cual concuerda con lo reportado en otros estudios en los que se ha visto un incremento en la frecuencia del alelo ϵ_4 en pacientes con EA (la frecuencia del alelo en EA es aproximadamente de 40%, comparado con el 15% en la población normal) (Poli, et. al., 2008). También se observa un aumento en la frecuencia del genotipo ϵ_2/ϵ_3 en el grupo con EA.

Para la realización del análisis de la relación entre el alelo ϵ_4 y la EA se utilizó la Prueba exacta de Fisher, la cual se puede aplicar para verificar si existe asociación estadística entre dos variables cualitativas nominales (tablas 2x2) (Martinez, et. al., 2001). No tiene requisitos de aplicación. Por tanto, al ser un método más exacto, es siempre recomendable utilizarlo al comparar proporciones. Se puede utilizar en vez de la ji cuadrada, cuando uno de los valores esperados es menor de 5 (Wayne, et. al., 2002) y como se observó en la Tabla 11 se tienen datos con valores menores a 5.

Esta prueba indica que no existe relación entre la presencia del alelo ϵ_4 de la APOE y la EA dentro de la muestra trabajada ($P=1$). Este valor es similar a los reportados para Chinos (Zhou, et. al., 2008) y Colombianos, (Jicha, et. al., 2008) pero es significativamente diferente a los valores reportados para otras poblaciones y grupos étnicos en los cuales sí se ha encontrado relación. Esta observación enfatiza la importancia de la localización geográfica y la diversidad de grupos étnicos (Hill, et. al., 2007). La asociación entre ϵ_4 y EA debe ser confirmada con numerosos estudios y en diferentes grupos étnicos, ya que muchos reportan la asociación entre ϵ_4 y EA, debido a que es posible que existan excepciones, como los negros americanos y los hispanoamericanos (Liu, et. al., 2008).

Los valores de OR para los diferentes genotipos encontrados indica que:

- En la Tabla 13 el valor de OR es de 1 por lo que el riesgo de presentar la enfermedad es la misma para ambos genotipos.
- El resultado de OR para la tabla 14 y 15 es de 0.5 por lo que no hay relación entre la enfermedad y el genotipo que se presenta.
- Así mismo se observa en la tabla 16 que el riesgo de presentar EA es igual para ambos sexos.

El Riesgo Relativo (RR) es la razón del riesgo de desarrollar la enfermedad entre individuos con el factor de riesgo con respecto al riesgo de desarrollar la enfermedad entre individuos sin el factor de riesgo. El valor de RR puede ser cualquiera entre cero e infinito. Un valor de cero indica que no existe asociación entre el estado del factor de riesgo y el estado de la variable dependiente. RR se interpreta como 1 para significar que el riesgo de adquirir enfermedad es la misma para aquellos individuos con el factor de riesgo y

aquellos sin el factor de riesgo. Un valor de RR mayor que 1 indica que el riesgo de adquirir la enfermedad es mayor entre los individuos con el factor de riesgo que entre los individuos sin el factor de riesgo (Joseph, et. al., 1981).

Existen, básicamente, dos tipos de estudios por observación, estudios prospectivos y estudios retrospectivos. El estudio prospectivo es un estudio por observación donde se seccionan dos muestras aleatorias para los individuos. Una muestra consiste en individuos que poseen el factor de riesgo, y la otra muestra consiste en individuos que no poseen el factor de riesgo. El estudio retrospectivo es el inverso del estudio prospectivo. Se seleccionan muestras a partir de aquellos que caen dentro de las categorías de variable resultado. El investigador mira hacia atrás (es decir, revisa de manera retrospectiva) en los individuos y determina cuáles tienen (o tuvieron), y cuáles no tienen (o no tuvieron) el factor de riesgo. A partir de estos estudios también es posible elaborar tablas de contingencia. Pero no se puede utilizar el cálculo del riesgo relativo (Joseph, et. al., 1981).

Actualmente una medida muy utilizada es la que se denomina "odds ratio" (OR), para la que no hay un término en castellano que sea bien aceptado. El odds (ventaja) es otra forma de representar un riesgo, mediante el cociente entre el número de veces que ocurre el suceso frente a cuántas veces no ocurre. Está claro que la interpretación del riesgo relativo es más intuitiva que la del odds ratio ¿Por qué entonces se usa tanto éste último? Hay varias razones. En primer lugar puede ser calculado en cualquier tabla 2X2, mientras que el riesgo relativo no se puede calcular en los estudios caso - control, debido a que la muestra es fijada por el investigador (Joseph, et. al., 1981).

Por otro lado permite examinar el efecto que otras variables pueden causar en esa asociación (como podrían ser por ejemplo la edad, el sexo, etc.). Otra propiedad del odds ratio es que no varía aunque se cambie el orden de las categorías en cualquiera de las variables, lo que no ocurre con el riesgo relativo. Por otro lado, cuando los riesgos (o los odds) en ambos grupos son pequeños (inferiores al 20%) el odds ratio se aproxima bastante al riesgo relativo pudiendo considerarse como una buena aproximación de éste. El cálculo del OR a partir de los datos de frecuencia de una tabla 2X2 es muy sencillo: (Joseph, et. al., 1981)

a	b
c	d

$$OR = (a \times d) / (b \times c)$$

Para comparar dos medias en más de dos grupos, se debe utilizar el análisis de la varianza de una vía, quedando abreviada ANOVA. El ANOVA no compara varianzas, sino medias y es la prueba indicada cuando se desea comparar más de dos medias de una variable cuantitativa. Es importante elaborar una comparación después de haber realizado un análisis de varianza ya que

permite observar, de una manera más clara la relación que se da entre las diferentes variables (Martinez, et. al., 2001).

Por medio del cálculo de la ANOVA se analizaron las medias para las diferentes edades en el grupo de pacientes con EA. Se encontró que la presentación de la enfermedad es dependiente de la edad. Como se observa en la comparación el genotipo $\epsilon 2/\epsilon 3$ se presenta con mayor frecuencia en el intervalo de 66 a 75 años, el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ y $\epsilon 3/\epsilon 4$ tienen una mayor frecuencia a partir de los 56 años y el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ se presenta únicamente en el intervalo de 45 a 55 años. Lo cual está mostrando que aunque el alelo $\epsilon 2$ está presente en el grupo de individuos con EA, pueda estar ejerciendo un efecto de retardo en la presentación de la enfermedad comparándolo con los alelos $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. Así mismo se observa que este último se está presentando únicamente en individuos con EA jóvenes. Los sujetos con EA portadores de uno o dos alelos $\epsilon 4$, muestran presentación temprana de la enfermedad ($p < 0.001$). Estos datos sugieren que el alelo $\epsilon 4$ incrementa el riesgo de la EA en diferentes poblaciones (Hill, et. al., 2007). En una muestra del sur de Italia se reporta que la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ de APOE es muy alta en pacientes con EA temprana y el alelo $\epsilon 2$ juega un papel protector (Uwe, et. al., 1998). En diversos estudios se muestra que el riesgo de padecer EA se incrementa con la edad y la presentación temprana aumenta con el número de alelos $\epsilon 4$ que se porte. En contraste, el alelo $\epsilon 2$ de APOE confiere una relativa protección a la presentación de la EA disminuyendo el riesgo y retardando la edad de presentación (Growdon, et. al., 2008). Por otro lado se ha establecido de forma más significativa, la interrelación que existe entre el número de copias de $\epsilon 4$, y la edad de presentación de la enfermedad, ya que la enfermedad se desarrolla a edades más tempranas en sujetos con genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ que en sujetos heterocigotos. En sujetos con el alelo $\epsilon 2$, se retrasa la edad de presentación (Bour, et. al., 2008).

8. CONCLUSIONES.

- La frecuencia alélica en el total de la muestra es de 95.65% para el alelo ϵ_3 , 20.65% para el alelo ϵ_4 y de 17.4% para el alelo ϵ_2 .
- Se encontraron 4 diferentes genotipos para APOE en la muestra (ϵ_2/ϵ_3 , ϵ_3/ϵ_3 , ϵ_3/ϵ_4 , y ϵ_4/ϵ_4), y la frecuencia que se obtuvo para cada uno de los grupos fue de 74.42% para ϵ_3/ϵ_3 , 13.95 para ϵ_3/ϵ_4 , 9.3% para ϵ_2/ϵ_3 y 2.33% para ϵ_4/ϵ_4 en el grupo control. En el grupo con DTA: ϵ_3/ϵ_3 con 51.02%, ϵ_2/ϵ_3 con 24.49%, el ϵ_3/ϵ_4 con 18.37% y el ϵ_4/ϵ_4 con 6.12%.
- No hay relación entre el alelo ϵ_4 para APOE y desarrollar la Enfermedad de Alzheimer ($p = 1$) como tampoco existe una diferencia entre la presentación de la enfermedad y portar los alelos ϵ_2 (heterocigoto) y ϵ_4 (homocigoto o heterocigoto) OR = 1. Pero si se observa un incremento en la presencia del alelo en el grupo con probable EA y el grupo control.
- El alelo ϵ_2 retarda la aparición de la enfermedad en comparación al alelo ϵ_3 . El alelo ϵ_4 colabora con la presentación temprana de la enfermedad. Por lo que si existe relación entre la edad y la EA.
- La EA se presenta en mayor frecuencia en mujeres que en hombres.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- ✓ Alachkar H., Katakai M., Scharre D. W., Papp A., Sadee W., (2008) Allelic mRNA expression of sortilin-1 (SORL1) mRNA in Alzheimer's autopsy brain tissues. *Neuroscience Letters* 448: 120-124.
- ✓ Andersen K, Launer LJ, Dewey M. E., (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The Eurodem Studies. Eurodem Incidence Research Group. *Neurology* 53 (9): 1992-7.
- ✓ Andreoli E., Lucienne A. W., Bruin W. A., (1999) Compendio de medicina interna. 4ª edición. Editorial McGraw - Hill Interamerican. pp. 786 y 787.
- ✓ Aranega J. A., Carninci P., Schneider C., (2002) Aplicación de técnicas de biología molecular en genética clínica. Editorial Universidad de Granada. pp. 9 - 25, 83.
- ✓ Bloss C. S., Delis D. C., Salmon D. P., Bondi M. W., (2008) Decreased cognition in children with risk factors for Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 64: 904-906.
- ✓ Bour A., Grootendorst J., Vogel E., Kelche C., Dodart J. C., Bales K., Moreau P. H., Sullivan P. M., Mathis C., (2008) Middle-aged human apoE4 targeted-replacement mice show retention deficits on a wide range of spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research* 193: 174-182.
- ✓ Bozena M. K., Dagmar K., Sukontasup T., Dickson D., Frackowiak J., (2003) The effect of oxidative stress on accumulation of Apolipoprotein $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ in a cell culture model of β -amyloid angiopathy (CAA). Elsevier. 48 - 57.
- ✓ Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., MH Arrighi (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* 3 (3): 186-91.
- ✓ Chun W, Johnson GV (2007). The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death. *Front. Biosci.* 12: 733-56.
- ✓ Devanand D. P., Liu X., Tabert M. H., Pradhaban G., Cuasay K., Bell K., Leon M. J., Doty R. L., Stern Y., Pelton G. H., (2008) Combining early markers strongly predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 64: 871-879.
- ✓ Di Carlo A, Baldereschi M, Amducci L, et. al. (2002). Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. *J Am Geriatr Soc* 50 (1): 41-8.
- ✓ Enzo E., Peros E., Tomaino C., Feudatari E., Bernardi L., Binetti G., Maletta R., D'Angelo A., Montagna L., Bruni A.C., Geroldi D. (2004). Apolipoprotein(a) null phenotype is related to a delayed age at onset of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 357: 45-48.
- ✓ Ezquerro M., Campdelacreu J., Gaig C., Compta Y., Muñoz E., Martí M. J., Valldeoriola F., Tolosa E., (2008) Lack of association

- of APOE and tau polymorphisms whit dementia in Parkinson´s disease. *Neuroscience Letters* 448: 20-23.
- ✓ Fan J., Hu Z., Zeng L., Lu W., Tang X., Zhang J., Li T., (2008). Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *Developmental Neuroscience*. 26: 523-534.
 - ✓ Fauci A.S., Braunweld E., Isselbacher K., Wilson J.D., Martin B., Kasper D.L., Hauser S.L., Lango D.L. (2007). *Principios de Medicina Interna*. 14 Ed. Editorial McGraw Hill. Pp. 1432-1444.
 - ✓ Ferri CP, Prince M, Brayne C, et. al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366 (9503): 2112-7.
 - ✓ Florence R., Philippe A., (2001) Genetic susceptibility factors for Alzheimer´s disease. (Review). *Elsevier*. 412: 1 - 12.
 - ✓ Fraser Paul E, et. al. (2000) Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1502: 1-15.
 - ✓ Ganong F. W. et. al. (2002) *Fisiología médica*. 18a. edición, Editorial El Manual Moderno. pp. 59 – 70.
 - ✓ Ghania A., Abdullah L., Volmar C., Volmar C. H., Paris D., Cheryl A. L., Quadros A., Mouzon B. M., Mullan M. A., Keegan A. P., Parrish J., Crawford F. C., Mathura V. S., Mullan A. J., (2008). Diagnostic utility of APOE, soluble CD40, CD40L, and A β 1-40 levels in plasma in Alzheimer´s disease. *Cytokine*. 1016:08-13.
 - ✓ Growdon J. H., (2008) Apolipoprotein E and alzheimer disease. *Neurology*. 55(8): 1053 – 1054.
 - ✓ Guerrero C. J. L., (1997) Determinación de la frecuencia del gen de la apolipoproteína E en una muestra de la población mexicana normal. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. pp.55.
 - ✓ Guimerá A., Gironés X., Cruz F. F., (2002) Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. Instituto de Ciencias Neurológicas y Gerontológicas. <http://www.pgmacline.es/revpatologia/volumen35/vol35-num1/vol35-04.htm>
 - ✓ Guyton M., (1993) *Tratado de Fisiología Médica*, 8ª Edic. Interamericana-McGraw-Hill. Pág. 198.
 - ✓ Harrison, et. al., (1979) *Medicina Interna*. Vol. II. 6ª edición. Editorial La Prensa Médica Mexicana. Pág. 2033.
 - ✓ Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA (2003). Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol*. 60 (8): 1119-22.
 - ✓ Hill JM, Bhattacharjee PS, Neumann DM (2007). Apolipoprotein E alleles can contribute to the pathogenesis of numerous clinical conditions including HSV-1 corneal disease. *Exp Eye Res* 84 (5): 801-811.
 - ✓ Holmes C, Boche D, Wilkinson D, (2008). Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer´s disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372 (9634): 216-23.

- ✓ Hormuzdi SG, Filippov MA, Mitropoulou G, Monyer H, Bruzzone R. (2004) Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochim-Biophys. mar* 23;1662(1-2):113-37.
- ✓ Horsburgh K., McCarron M. O., White F., James A. R. N., (2000) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease, acute brain injury and cerebrovascular disease. *Neurobiology of Aging*. 245-255.
- ✓ Jameson J. L., Hyslop G., (1998) Principles of molecular medicine. pp. 901 – 905.
- ✓ Jeffrey L., et. al. (2002) Alzheimer disease. *Journal American Medical Association*. 287(18): 2335-2338.
- ✓ Jicha G. A., Parisi J. E., Dickson D. W., Cha R. H., Johnson K. A., Smith G. E., Boeve B. F., Petersen R. C., Knopman D. S., (2008) Age and apoE associations with complex pathologic features in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences* 273 (6): 34-39.
- ✓ Joseph L. F., et. al. (1981) Statical methods for rates and proportions. Ed. John Wiley. pp. 225-230.
- ✓ Liu F., Pardo L. M., Schuur M., Pascual S. J., Slegers K., Koning I., Zorkoltseva I. V., Axenovich T. I., Witteman J. C. M., Janssens A. C., Swieten J. C., (2008) The apolipoprotein E gene and its age-specific effects on cognitive function. *Neurobiology of aging* 15 (9): 1-3.
- ✓ Martinez G. M. A., Jokin E. I., et. al. (2001) Biostatística amigable. Editorial Diaz De Santos. pp. 187 - 191, 292 – 311.
- ✓ Mathews K.C. Van Holde K.E. 2000. *Bioquímica*. 2ª ed. España. McGraw-Hill Interamericana. p.p. 689-891, 1001 y 1002.
- ✓ Matthew N. Levy, Bruce A. Stanton, Bruce H. Koeppen, (2006) *Fisiología*. 4ª edición. Editorial Elsevier. pp.75 – 79.
- ✓ McNamara M. J., Gomez I. T., Hyman D., Bradley T., (1998) Apolipoprotein E genotype and deposits of Abeta 40 and Abeta42 in Alzheimer disease. *Neurology*. 55(7): 1001 – 1004.
- ✓ Metzker M. L., Caskey T. C., (2001). A fast method for high-quality Genomic DNA extraction from whole human blood. *BioTechniques*. BioFeedback Vol.11, No.3 1991: 298-299.
- ✓ Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. (2008). *Bioquímica de Harper*. 12 Ed. Editorial El Manual Moderno. Pp. 235-250.
- ✓ Pareja B., et. al. (2008). Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *J Neurol. Sci* 264 (1-2):63-72.
- ✓ Poli M., Gatta L. B., Lovati C., Mariani C., Galimberti D., Scarpini E., Biunno I., Musicco M., Dominici R., Albertini A., Finazzi D., (2008) Interaction between the APOE ε4 allele and the APH-1b c+651T>G SNP in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 29: 1494-1501.
- ✓ Praticó D. (2008) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. *Elsevier*. 30:1-10.

- ✓ Rangel C. (2008) Psicología del Cerebro. Editorial Innova. Pp. 103 – 110.
- ✓ Silva E. J. G., Berumen C. J., Valdés E. R. A., et., (2002) Genotificación de la Apolipoproteína E en individuos de la población mexicana con demencia tipo Alzheimer. Revista Neurología. 35 (3): 119 – 124.
- ✓ Singh P. P., Singh M., Mastana S. S., (2006). APOE distribution in world populations whit new data from India and the UK. Ann. Hum. Biol. 33 (3): 279-308.
- ✓ Stanley W. J., Robbins L., (1985) Anatomía y Fisiología humana. 4ª edición. Editorial Interamericana McGraw – Hill. pp. 236 – 254.
- ✓ Sorbi S., et. al., (2001) Genetic risk factors in familial Alzheimer´s disease. Mechanims of Ageing and Development. 122: 1951 – 1960.
- ✓ Takahashi R.H., Zarate E. C., Lin M. T., Milner T. A., Gouras G. K., (2008) Co-occurrence of Alzheimer´s disease β -amyloid and tau pathologies at synapses. Neurobiology of Aging. 1016: 1-8.
- ✓ Thomson W.M., Nussbaum R. L., Williard H. F., (2004) Genética en Medicina. 5ª ed. p. 105 – 107.
- ✓ Uwe Beffert, Marc Dnik, et. al. (1998) The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer´s disease. Brain Reserch Reviews. 27: 119 – 142.
- ✓ Watson J. D., Baker T. R., et. al. (2005) Biología Molecular del Gen. 5ª ed. Madrid. Medica Panamericana. p. 696 – 703.
- ✓ Wayne D., et. al. (2002) Bioestadística: basis para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª. Edición. Editorial Limusa Wiley. pp. 306, 307, 614 – 623.
- ✓ Wenk GL (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer´s disease. J. Clin Psychiatry 64 Suuppl 9: 7-10.
- ✓ World Health Organization (2006). Neurological Disorders: Public Health Challenges. Switzerland: World Health Organization, 204-207.
- ✓ Zhou Y. T., Zhang Z. X., Chan P., He X. H., Tang M. N., Wu C. B., Hong Z., (2008) Genetic association between low-density lipoprotein receptor-related protein gene polymorphisms and Alzheimer´s disease in Chinese Han population. Neuroscience Letterz 444 (93): 109-111.
- ✓ Zhu M., Gu F., Shi J., Hu J., Hu Y., Zhao Z., (2008). Increased oxidative stress and astrogliosis responses in conditional double-knockout mice of Alzheimer-like presenilin-1 and presenilin-2. Free Radical Biology and Medicine. 45: 1493-1499.

Referencias Electrónicas:

- ✓ http://www.salud.gob.mx/unidades/dgcs/sala_noticias/campanas/2001-09-21/presentacion.htm
- ✓ <http://www.universomedico.com.mx/salud/alzheimer2.shtml>