



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud
Investigación Clínica Experimental en Salud
Farmacología Clínica

Asociación genética de *ACAT1/SOAT1* con enfermedad de Alzheimer y otras demencias en población mexicana y su posible aplicación como blanco terapéutico

Tesis
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
Jessica Sarahi Alavez Rubio

Tutora:
Dra. Teresa Juárez Cedillo
Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica
Instituto Mexicano del Seguro Social

Ciudad de México, México, octubre 2019



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.

Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias
Campo disciplinario: Farmacología Clínica

Título: Asociación genética de *ACAT1/SOAT1* con enfermedad de Alzheimer y otras demencias en población mexicana y su posible aplicación como blanco terapéutico

Directora de Tesis

Dra. Teresa Juárez Cedillo

Investigador Titular C

Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica

Instituto Mexicano del Seguro Social

Hospital General Regional No 1 Carlos Mcgregor Sánchez Navarro.

Correo electrónico: terezillo@exalumno.unam.mx / teresa.juarez@imss.gob.mx

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo otorgado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT Salud-233065.

Al Programa Becarios de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. Normand García Hernández por las facilidades otorgadas en el laboratorio de Genética Humana en Centro Médico Nacional S-XXI

Al Laboratorio de Genómica, del departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Tabla de contenido

1. Resumen	1
2.Marco teórico	3
2.1 Demencia	3
2.1.1 Epidemiología de la demencia	3
2.2 El papel de los lípidos en DVa y EA	5
2.2.1 El Colesterol y DVa	6
2.2.2 El colesterol y EA	7
2.2.2.1 El colesterol y las placas amiloides.....	8
2.3 Mecanismos de homeostasis del colesterol en el cerebro.....	9
2.4 ACAT1/SOAT1	11
2.4.1 La relación de ACAT1 con EA.....	12
2.5 Inhibidores de ACAT1	13
2.5.1 Mecanismo propuesto del efecto del bloqueo de ACAT1 en demencia	17
2.6 En busca de un tratamiento	19
2.7 Farmacogenética de los blancos terapéuticos.....	22
3. Justificación.....	27
4.Planteamiento del problema.....	28
4.1 Pregunta de investigación	28
5. Objetivos.....	29
6. Métodos	30
6.1 Diseño del estudio	30
6.2 Población.....	30
6.3 Calculo del tamaño de la muestra.....	30
6.4 Criterios de selección	31
6.5 Variables	32
6.6 Metodología clínica y de laboratorio	37
6.7 Extracción de ADN	38
6.8 Genotipificación.....	38

6.9 Análisis estadístico	39
6.9.1 Análisis descriptivo y de asociación	39
6.9.2 Modelos genéticos	40
6.9.3 Haplotipos.....	40
7. Aspectos éticos	41
8.Resultados	42
8.1 Características de la población de estudio.....	42
8.2 Frecuencias alélicas.....	44
8.3 Modelos de herencia.....	45
8.4 Desequilibrio de ligamiento y haplotipos.....	48
9. Discusión.....	50
10. Conclusiones	55
11. Perspectivas futuras.....	56
12. Referencias.....	57
13. Anexo.....	64
13.1 Extracción de DNA.....	64

Índice de figuras

Figura 1. Potencial mecanismo en la supresión de ACAT1	18
Figura 2. Mapa de desequilibrio de ligamiento	48

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de los principales resultados y aportaciones de los estudios con inhibición de ACAT1.....	15
Tabla 2. Estudios de asociación genética entre ACAT1 y EA.....	25
Tabla 3. Polimorfismos estudiados.....	33
Tabla 4. Genotipos para cada polimorfismo	34
Tabla 5. Variables clínicas y sociodemográficas.....	35
Tabla 6. Polimorfismos y número de ensayo en Thermo Fisher	38
Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR	38
Tabla 8. Condiciones de la reacción de PCR	39
Tabla 9. Características generales de los grupos de estudio	43
Tabla 10. Frecuencia alélica de los polimorfismos	44
Tabla 11. Frecuencias y riesgos de los genotipos para cada polimorfismo.....	45
Tabla 12. Modelos de herencia para los polimorfismos	46
Tabla 13. Modelos de herencia y variables relacionadas con el desarrollo de demencia.	47
Tabla 14. Medidas de DL entre polimorfismos de ACAT1	48
Tabla 16. Frecuencia de haplotipos en pacientes con demencia y control.....	49

Abreviaturas

24-OHC: 24-hidroxicolesterol

A β : beta-amiloide

ACAT: Acilcoenzima A: colesterol aciltransferasa 1

APOE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora de amiloide

C-HDL: Colesterol unido a lipoproteína de alta densidad

C-LDL: colesterol unido a lipoproteína de baja densidad

CT: Colesterol total

DVa: Demencia vascular

EA: Enfermedad de Alzheimer

EA/DVa: Demencia mixta

ICE: Inhibidores de colinesterasa

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

NINCDS-ADRDA: National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

NINDS-AIREN: National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences

NFTs: Ovillos neurofibrilares

NMDA: N-metil-D-aspartato

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds ratio, RM: Razón de momios

RE: retículo endoplásmico

SADEM: Estudio sobre el envejecimiento y la demencia en México

SNC: Sistema nervioso central

SNPs: Polimorfismo de nucleótido único

TFEB: Factor de transcripción EB

1. Resumen

Antecedentes: La demencia es una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre los adultos mayores alrededor del mundo y pese a los esfuerzos realizados aún no dispone de una cura. Recientemente se han asociado alteraciones en la homeostasis del colesterol con el desarrollo de demencia. La enzima acilcoenzima A: colesterol aciltransferasa 1 (ACAT1) tiene una función importante en el metabolismo del colesterol, al participar en la formación de ésteres de colesterol a partir de colesterol libre, existe evidencia de que los ésteres de colesterol favorecen la producción de A β , péptido involucrado en la enfermedad de Alzheimer (EA). Se ha observado que al bloquear la actividad de ACAT1 se obtienen efectos benéficos sobre los síntomas y el progreso de la enfermedad, por lo que se ha sugerido que modificaciones en ACAT1 podrían estar relacionados con la presencia de demencia señalándose como un posible blanco terapéutico, surgiendo así la siguiente pregunta: ¿Los polimorfismos presentes en *ACAT1/SOAT1* están asociados a la presencia de la EA y otras demencias en población mexicana?

Objetivo: Investigar la asociación de los polimorfismos del gen *ACAT1* con la susceptibilidad genética para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias en población mexicana y analizar teóricamente su posible aplicación como blanco terapéutico.

Método: Se realizó un estudio de casos y controles, con los pacientes de 60 años y más pertenecientes a la cohorte del Estudio sobre el Envejecimiento y la Demencia en México (SADEM). Los pacientes fueron diagnosticados y clasificados según el tipo de demencia de acuerdo con los criterios del DMS-IV, la NINCDS-ADRDA y la NINDS-AIREN. Se obtuvieron los datos clínicos y sociodemográficos de los pacientes a través de un cuestionario construido para el estudio. Se determinaron los polimorfismos del gen *ACAT1* (rs1044925, rs2247071, rs2862616, rs3753526), seleccionados considerando los estudios de asociación previamente publicados. Estos polimorfismos se determinaron mediante sondas TaqMan en un

equipo de PCR en tiempo real. Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se realizó la descripción de las variables clínicas y sociodemográficas de la población en estudio. Posteriormente se examinó la asociación de los polimorfismos con demencia considerando la edad, el sexo, nivel de glucosa, enfermedad vascular-cerebral (EVC) y consumo de alcohol. Mediante el programa Haploview se identificaron los haplotipos presentes en el gen *ACAT1* y su asociación con demencia.

Resultados y discusión: Se incluyeron un total de 400 participantes (109 pacientes con enfermedad de Alzheimer, 59 con demencia vascular y 28 pacientes con demencia mixta). El porcentaje total de mujeres fue del 64.5%, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. Los individuos con demencia mostraron menor nivel de educación (5.71 ± 5.49 vs 6.55 ± 5.09 ; $p=0.0252$), niveles de glucosa menor (112 (95.5-149) vs 97 (90.5-105.5); $p<0.0001$), y de forma general una disminución en los niveles de las variables relacionadas con la composición corporal ($p<0.05$). Los sitios polimórficos rs3753526 y rs1044925, se encontraron asociados a demencia (OR=2.81, IC 95%=1.80-4.41; OR=3.48, IC 95%=2.07-5.85). Se identificó un haplotipo de riesgo (CGGA, OR=1.87, IC 95%=1.34-2.60, $p<0.001$) y uno de protección (CGCA, OR=0.34, IC 95%=0.23-0.46, $p<0.001$).

Conclusión: Los resultados sugieren que la enzima ACAT1 participa en la susceptibilidad para padecer demencia entre nuestra población. Se requieren más estudios para conocer si estos polimorfismos realmente modifican la actividad enzimática y en qué medida, y de esta forma contribuir en aclarar el mecanismo por el cual el metabolismo del colesterol se relaciona con el desarrollo de demencia. La evidencia contribuye a la hipótesis de que ACAT1 podría ser un blanco terapéutico para el tratamiento de la demencia.

2. Marco teórico

2.1 Demencia

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define demencia como un síndrome - generalmente de naturaleza crónica o progresiva- en el cual hay una alteración de múltiples funciones corticales superiores, incluyendo la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el lenguaje, la capacidad de aprender y de realizar cálculos, y la toma de decisiones. Los síntomas van más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal. El deterioro de la función cognitiva suele ir acompañado y en ocasiones es precedido, por el deterioro del control emocional, el comportamiento social o la motivación (1).

La demencia es causada por diversas enfermedades y lesiones que afectan al cerebro de forma primaria o secundaria, como la enfermedad de Alzheimer (EA) o los accidentes cerebrovasculares, relacionados con demencia vascular (DVa), otros tipos de demencia son: la causada por cuerpos de Lewy y la demencia frontotemporal. Los límites entre los subtipos no son muy claros, por lo que a menudo coexisten formas mixtas (1).

2.1.1 Epidemiología de la demencia

En el año 2011, se calculó que, a nivel mundial, 35,600 millones de personas vivían con demencia, y estudios epidemiológicos estiman que para el año 2050 existan 115.4 millones. Además de que las cifras y los costos son enormes, el impacto en lo médico, lo psicológico y lo emocional, en los pacientes, sus cuidadores y familiares es muy alto (1).

La EA es la forma más común de demencia y probablemente contribuye en un 60-70% de los casos (1). Los pacientes con EA muestran pérdida de sinapsis y neuronas, así como placas seniles extracelulares y ovillos neurofibrilares (NFTs) (2). Las placas seniles son un agregado de péptido β -amiloide ($A\beta$), generado a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) (3,4). Los NFTs, son la acumulación

intraneuronal de agregados insolubles de tau. En condiciones normales tau se une y estabiliza los microtúbulos en los axones, sin embargo, bajo condiciones patológicas, tau se vuelve hiperfosforilada, causando desprendimiento de los microtúbulos y promoviendo la formación de agregados insolubles, lo que conduce a la aparición de filamentos helicoidales y a la presencia de NFTs en los cerebros de pacientes con EA. Aunque el deterioro cognitivo asociado a EA se relaciona fuertemente con la acumulación de A β y la severidad de la patología tau, la relación precisa entre estas dos características patológicas aún no es clara (5).

En la patogénesis de EA existen diversos factores etiológicos y patogénicos, tales como homeostasis alterada del calcio, factores genéticos, hormonales, inflamatorios o inmunológicos, disfunción vascular y desregulación del ciclo celular, que conducen a una disfunción del sistema de neurotransmisores y consecuentemente a un declive cognitivo (2).

Por otra parte, la DVa representa del 17-25% de los casos de demencia (6), es resultado de efectos generales y locales de la enfermedad vascular, que ocasiona lesiones por accidente cerebro vascular y otros cambios en la perfusión tisular (7). Según los criterios del “National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Association Internationale pour la Recherche et l’Enseignement en Neurosciences (NINDS-AIREN)”, que son los más utilizados para DVa, el diagnóstico es soportado por la evidencia de presencia de demencia y de enfermedad cerebrovascular, interrelacionados (8).

La etiología de DVa comprende daño en los vasos grandes y pequeños, siendo la enfermedad cerebral de vasos pequeños la causa más común (6). Los síntomas clínicos varían ampliamente dependiendo de las causas y la localización del daño, en vasos grandes comúnmente genera múltiples infartos corticales y un síndrome de demencia multifocal cortical, mientras que el daño en vasos pequeños, usualmente como resultado de la hipertensión y diabetes, causa isquemia de la sustancia blanca periventricular y accidentes cerebrovasculares lacunares caracterizados clínicamente por demencia subcortical con déficit del lóbulo frontal, disfunción ejecutiva, lento procesamiento de la información, memoria deteriorada, cambios de humor depresivos, ralentización de la función motora, características

parkinsonianas, marcha de paso pequeño, alteraciones urinarias y parálisis pseudobulbar (9).

Muchos de los factores de riesgo para enfermedad cerebrovascular y para DVa incluyendo los factores circulantes como el colesterol total (CT) en plasma, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL), o enfermedades vasculares como diabetes mellitus, fibrilación auricular, hipertensión, aterosclerosis, hipercolesterolemia y tabaquismo también representan un factor de riesgo para EA. El grado en el que estos factores de riesgo contribuyen al deterioro cognitivo puede estar influenciado por factores genéticos (6,7,9). Los desórdenes microvasculares podrían contribuir a la patogénesis de EA y sinérgicamente al deterioro cognitivo relacionado con su patología (9). El principal factor de riesgo para desarrollar EA es la edad, sin embargo, existen factores asociados al estilo de vida que pueden aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad, como: el consumo de alimentos ricos en calorías y un estilo de vida sedentario, y otros factores, como: un menor nivel de educación, enfermedades vasculares y factores genéticos (10).

En la búsqueda de factores de riesgo y rutas metabólicas involucradas en el desarrollo de demencia, y a partir de los hallazgos que relacionan niveles altos de colesterol con el desarrollo de EA y DVa, y la importancia del colesterol en el funcionamiento del cerebro, se ha ligado el metabolismo alterado del colesterol con padecimientos neurodegenerativos.

2.2 El papel de los lípidos en DVa y EA

Dentro de los lípidos, el colesterol tiene un papel fundamental en la fisiología y función del cerebro, la desregulación de la homeostasis del colesterol se ha asociado con la aparición de trastornos cerebrales y enfermedades neurodegenerativas importantes (11–13). Los hallazgos sugieren que para la neurodegeneración la distribución intracelular del colesterol puede ser más importante que las alteraciones en los niveles de colesterol total. El tráfico de colesterol, la acumulación en la membrana plasmática, endolisosomas y en

mitocondria pueden ser más relevantes en la progresión de la enfermedad, regulando vías de señalización específicas y la función del compartimiento intracelular (13).

Aunque ya se habían reportado alteraciones en la composición lipídica en tejido cerebral de individuos con EA, se logró establecer un vínculo entre el metabolismo lipídico y EA cuando el alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (*APOE*) fue identificado como el factor de riesgo genético más fuerte para Alzheimer esporádico, los individuos que son portadores de una o dos copias del alelo $\epsilon 4$ tienen un mayor riesgo de desarrollar EA (14–17), esta relación no se ha logrado establecer para DVa (18–22). *APOE* codifica una proteína que funciona como un crucial regulador del metabolismo del colesterol en el cerebro y del metabolismo de triglicéridos a través del cuerpo (2). La importancia de ApoE4 en la patología amiloide está respaldado por la evidencia de que se une a $A\beta$ y modula su agregación y eliminación (23), los portadores del alelo $\epsilon 4$ muestran un incremento en la formación de placa amiloide (23,24). Además, está relacionado con múltiples mecanismos de relevancia para la EA, como la neurogénesis, el metabolismo de glucosa, función sináptica, cognición, función mitocondrial, atrofia neuronal, neuroinflamación y fosforilación de tau (13).

2.2.1 El Colesterol y DVa

Existe una gran variedad de mecanismos patológicos involucrados en el desarrollo de DVa, donde los lípidos tienen vital importancia, por ejemplo la oxidación lipídica, a la cual el cerebro es particularmente susceptible debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (6). Tanto los niveles elevados del colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) como los niveles bajos de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) son factores de riesgo para aterosclerosis carotídea y enfermedad arterial coronaria, lo que puede resultar en un deterioro cognitivo secundario, hipoperfusión cerebral o embolia (6), sin embargo, la relación existente con DVa es controversial, por una parte se ha reportado que no se

encontró asociación entre los niveles de C-LDL y marcadores de imagen obtenidos mediante resonancia magnética nuclear (25,26), sin embargo, Longstreth y colaboradores (27) encontraron asociaciones no esperadas para los niveles de C-HDL y C-LDL con hiperintensidades de la sustancia blanca, niveles más altos de C-HDL y niveles más bajos de C-LDL se asociaron con empeoramiento de hiperintensidades de la sustancia blanca, las cuales están relacionadas con EA (28). La asociación de los niveles de colesterol total con el deterioro cognitivo y con DVa tampoco es clara, se ha reportado que el nivel de colesterol total en la mediana edad es un predictor del deterioro cognitivo 21 años después (29), y que el incremento del colesterol se encuentra asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar DVa en un periodo de 30 años (30), sin embargo, también se han reportado resultados con asociación inversa (31).

2.2.2 El colesterol y EA

Desde 1906, cuando Alois Alzheimer (32) describió el primer caso de EA, él notó la presencia de placas de A β , ovillos neurofibrilares, y la presencia de “inclusiones adiposas” o “gránulos lipídicos” en células gliales, sugiriendo un metabolismo lipídico aberrante (11).

En 1990 Larry Sparks y sus colaboradores (33) observaron que los cerebros de los pacientes con enfermedad coronaria avanzada tenían placas seniles similares a las que se encontraban en pacientes con EA. En una publicación posterior, se reportó que una dieta alta en colesterol inducía la formación de placas en el tejido cerebral de conejos. Estas observaciones generaron interés en este tema y se comenzó a realizar investigaciones, desde estudios epidemiológicos retrospectivos y prospectivos sobre la relación del nivel de colesterol y EA hasta estudios animales, celulares y moleculares sobre el colesterol y la proteína A β (34).

Estudios en modelos animales e *in vitro* han revelado que niveles altos de colesterol promueven la formación de A β (35,36) y disminuyen la secreción de amiloide soluble (24,34,37,38). Además se han reportado niveles elevados de colesterol en las

membranas cerebrales de ratones adultos (39) y un aumento del flujo de colesterol a través del sistema nervioso central (SNC) en el envejecimiento y en EA temprana. En humanos, niveles elevados de colesterol en plasma han sido asociados con un mayor riesgo de desarrollar EA en edades avanzadas (40–42).

2.2.2.1 El colesterol y las placas amiloides

A β es un producto fisiológico normal del procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) y es un componente soluble del plasma y del líquido cerebroespinal (43). Es generado a partir de APP mediante escisión secuencial de β - y γ -secretasa (también llamada BACE-1). β -secretasa actúa en el segmento N-terminal, formando sAPP β soluble, seguido de la acción de γ -secretasa en el fragmento C-terminal para liberar A β . α -secretasa, también es capaz de escindir APP, pero esto ocurre dentro de la región A β , y por lo tanto se denomina no amiloidogénico (3,4). Después de que A β es generado, el péptido es catabolizado por peptidasas o depurado mediante otros mecanismos (44), sin embargo, cuando ocurre un desbalance entre la síntesis y su depuración, resulta una acumulación anormal de A β y la formación de oligómeros tóxicos (11). Existen dos variantes carboxilo terminal principales de A β , que se componen principalmente de péptidos de 40 y 42 aminoácidos (llamados A β 40 y A β 42, respectivamente), A β 40 es la especie principal secretada y encontrada en el líquido cefalorraquídeo (43), mientras que A β 42 es la especie predominante en las placas amiloides, y es más hidrófoba y menos soluble que A β 40; por lo tanto, es más propenso a la agregación y deposición, y es la causa de la neurotoxicidad y pérdida sináptica (43). Estas placas amiloides pueden ser directamente neurotóxicas, afectar las funciones sinápticas, inducir estrés oxidativo, incitar una respuesta inflamatoria, inducir la fosforilación de tau y alterar la homeostasis del calcio. Estos eventos pueden estar mediados por la interacción directa de A β con las membranas celulares, o por la unión de A β a los receptores celulares microgliales y neuronales (4,45).

Aunque el mecanismo por el cual el colesterol podría estar involucrado en EA permanece aún sin aclararse, se ha sugerido que las balsas lipídicas están involucradas en la biogénesis, el catabolismo, la agregación y la acumulación de A β , así como la neurotoxicidad mediada por A β (44,46). Se sabe que el colesterol se asocia con esfingolípidos en las membranas para formar microdominios organizados y resistentes a los detergentes conocidos como balsas lipídicas (47), las cuales desempeñan un papel central en diversos procesos celulares, incluidos el arreglo de membranas, el tráfico y la transducción de señales (44), anclan proteínas transmembrana importantes implicadas en la patogénesis de EA, incluyendo β - y γ -secretasa (37,48,49), por lo que el enriquecimiento de colesterol en las balsas lipídicas puede facilitar el reclutamiento de APP, β - y γ -secretasas a estos microdominios; y, en consecuencia, la producción de péptidos A β (50), tanto a través del reclutamiento de APP como del aumento del compartimento endosomal que favorece el reciclaje de APP de la superficie celular (51).

2.3 Mecanismos de homeostasis del colesterol en el cerebro

El cerebro es el órgano con el mayor contenido de colesterol, exhibe una concentración 10 veces mayor comparado con otros tejidos, y aunque sólo representa el 2.1% del peso corporal, contiene el 23% del colesterol total (52).

El colesterol existente en el cerebro es prácticamente producido en su totalidad por síntesis *de novo*, ya que la barrera hematoencefálica evita la absorción celular del colesterol de las lipoproteínas de la circulación sanguínea (53). En el sistema nervioso central, prácticamente todo el colesterol (>99.5%) se encuentra en su forma no esterificada (54), y la mayor parte se cree que reside en 2 grupos principales: cerca del 70% está presente en las vainas de mielina de oligodendrocitos (sustancia blanca) y el otro 30% está presente en las membranas plasmáticas de astrocitos y neuronas (54,55).

La homeostasis del colesterol es regulada por el equilibrio dinámico de la absorción, la síntesis *de novo*, la esterificación, el catabolismo y la liberación (53). El colesterol

celular es sintetizado principalmente en el retículo endoplásmico (RE) a partir del acetato en un complejo proceso que involucra alrededor de 30 etapas enzimáticas. El primer paso es la conversión de tres moléculas de acetyl-CoA a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) en el citoplasma y después la irreversible conversión a mevalonato con la enzima HMG-CoA reductasa (HMGR), proceso asociado con el retículo endoplasmático. Esto es seguido por una serie de reacciones enzimáticas que secuencialmente convierten mevalonato en 3-isopentenil pirofosfato, farnesil pirofosfato, escualeno, lanosterol y finalmente a colesterol en un proceso de 19 pasos, involucrando dos vías distintas pero relacionadas, la vía de Bloch y la vía de Kandutsch-Russel (53,56).

La biosíntesis de colesterol tiene una regulación compleja, cuando los niveles son bajos, la escisión de la proteína de unión a elementos reguladores de esterol (SREBP) unido al RE, induce la generación de factores de transcripción que se unen al elemento regulador de esterol (SRE-1) el cual controla la transcripción de HMGR y otros genes involucrados en el metabolismo y transporte de colesterol y otros lípidos. Los niveles altos de colesterol ejercen control mediante inhibición por retroalimentación y estimulando la ubiquitinación y degradación de HMGR por el proteasoma (53). La maquinaria celular que responde a un exceso de colesterol se expresa mayormente en neuronas que en astrocitos, por lo tanto las neuronas pueden manejar el exceso de colesterol por diferentes mecanismos, como la esterificación y posterior almacenamiento intracelular en gotas de lípidos, la excreción directa a través de transportadores ABC (ATP-binding cassette) (57,58) o la conversión a 24-OCH a través de CYP46A1 (59).

La esterificación del exceso de colesterol libre es catalizada por la enzima acilcoenzima A: colesterol aciltransferasa 1 (ACAT1) también llamada esterol O-aciltransferasa 1 (SOAT1) en el retículo endoplásmico (60), los ésteres de colesterol tienden a la coalescencia en medios acuosos y forman pequeñas gotas de lípidos citoplasmáticos, las cuales se acumulan en el interior o son expulsadas a través de la membrana en el ambiente extracelular (23,61). La acumulación de ésteres de colesterol en gotas lipídicas representa alrededor del 1% del total del colesterol contenido en el cerebro adulto (62).

La vía de mayor excreción de colesterol del cerebro es la hidroxilación de colesterol a 24-hidroxicolesterol (24-OHC) por el CYP46A1, que es responsable del 40-50% de la conversión (57). El 24-OHC es transportado por ApoE a la barrera hematoencefálica, donde es expulsada del cerebro mediante difusión o mediante transportadores de aniones orgánicos (11), una vez en la circulación, el 24-OHC se une a LDL, es captado por los hepatocitos y excretado en las sales biliares. La liberación de 24-OHC activa mecanismos de síntesis de colesterol, mientras que los niveles de colesterol superiores al umbral favorecen la expresión de CYP46A1 (63).

2.4 ACAT1/SOAT1

Como ya se mencionó la esterificación del exceso de colesterol libre es catalizada por la enzima ACAT1/SOAT1, la mayor parte de la investigación de ACAT1 se había enfocado como blanco terapéutico para tratar la aterosclerosis, sin embargo, se han mostrado efectos benéficos de la inhibición de esta enzima en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer y en una nueva área de interés, el cáncer (64–67).

El primer gen *ACAT* fue identificado en 1993 (68). ACAT tiene 2 isoformas y es miembro de la familia de enzimas MBOAT (membrane bound O-acyltransferase). En humanos, hay 11 miembros de la familia MBOAT, con diversas funciones biológicas, pero con mecanismos catalíticos similares. El principal sustrato para ACAT1 y ACAT2 es el colesterol, ambas enzimas utilizan una molécula de ácido graso acilcoenzima A de cadena larga como el donador de acil graso para convertir el colesterol a ésteres de colesterol (69).

ACAT1 es codificada por un gen localizado en 2 diferentes cromosomas, 1 y 7, con 18 exones (61). ACAT1 y ACAT2 tienen localización intracelular diferente y una función metabólica para cada enzima (70). ACAT1 se encuentra en el retículo endoplásmico y está expresada en prácticamente todos los tejidos, incluidos el cerebro, glándulas adrenales, riñón y macrófagos. ACAT2 regula la absorción de colesterol en las células de la mucosa intestinal y está expresada principalmente en

el intestino y en el hígado, aunque se expresa en otros tejidos, lo hace en mucho menor nivel que ACAT1 (69,70).

2.4.1 La relación de ACAT1 con EA

Se observó que en los cerebros de pacientes con EA y en modelos de ratones, el contenido de ésteres de colesterol es significativamente elevado en las regiones afectadas con placas amiloides, se ha sugerido que la compartimentación de colesterol intracelular y los ésteres de colesterol citoplásmicos formados por ACAT1 regulan la producción de A β (62,71).

La primera evidencia experimental que relacionó la actividad de ACAT y EA fue proporcionada por Puglielli y colaboradores (72), el estudio mostró en un modelo de células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) y un modelo de células neuronales, que los niveles de ésteres de colesterol se correlacionaron con la producción de A β . Los niveles crecientes de ésteres de colesterol potencian la liberación de A β en células cultivadas, mientras que la inhibición farmacológica de ACAT1 conduce a la reducción de A β y de ésteres de colesterol (23,61).

Considerando que el equilibrio entre el colesterol libre y los ésteres de colesterol es un punto clave en el control de la amiloidogénesis y con los resultados obtenidos la idea de que ACAT1 podría ser un blanco terapéutico se ha fortalecido (72–81), por lo que junto con β - y γ -secretasa, los únicos blancos terapéuticos que modulan directamente la generación de A β , los inhibidores de ACAT podrían ser parte de otra clase de compuestos que indirectamente modulan la generación de A β (73), mientras que otras estrategias se enfocan en la agregación y/o depuración.

2.5 Inhibidores de ACAT1

Los primeros fármacos inhibidores de ACAT, diseñadas para el tratamiento de la aterosclerosis, fueron moléculas con poca absorción, que actuaban localmente, bloqueando la absorción intestinal de colesterol, después de resultados desfavorables (82,83), la inhibición de ACAT intestinal no parecía una buena opción para la reducción del colesterol plasmático en humanos (84). Sin embargo, se continuó con la búsqueda de moléculas que actuaran directamente en el hígado o en las células de la pared vascular y se sintetizó el compuesto CI-976 (85), el cuál parecía que producía una inhibición directa de la actividad de ACAT en la pared arterial (84), pero presentaba toxicidad adrenal, para evitarlo, se desarrollaron inhibidores más hidrosolubles, de este modo se sintetizó CI-1011 (86), denominado avasimibe, el cuál llegó a probarse en estudios clínicos fase III (84), con resultados no favorables en la aterosclerosis coronaria evaluada por ultrasonido intravascular en un estudio multicéntrico con 509 pacientes (87).

Desafortunadamente, los prometedores resultados de los estudios realizados en animales no se han podido evidenciar en los estudios realizados en humanos. ACTIVATE (88) y CAPTIVATE (89) fueron diseñados para evaluar la seguridad y eficacia de pactimibe (un potente inhibidor de ACAT1 y ACAT2), los resultados no fueron favorables. En ACTIVATE no se observó disminución en el progreso de ateroma (90) y aunque CAPTIVATE tuvo que ser suspendido antes de lo planeado (por los resultados obtenidos en el primer estudio), en los resultados preliminares no se observaron diferencias significativas en las pruebas para evaluar el grosor de la íntima-media de la carótida (CIMT) y además, el grupo con pactimibe tuvo 7.3% de incremento en los niveles C-LDL comparado con 1.4% del grupo placebo ($p=0.001$) (89).

En el caso de EA se han obtenido resultados positivos (Tabla 1), la administración sistémica de CP-113,818 en un modelo animal con mutación hAPP₇₅₁ durante 60 días mostró reducción del déficit cognitivo y del número de placas de A β en un 88% ($p<0.0000016$) (73). Por su parte, avasimibe, también se probó en un modelo animal

con mutación hAPP₇₅₁, obteniendo como resultado una disminución en la carga amiloide limitando la generación e incrementando la depuración de A β (77).

El bloqueo de ACAT1 presenta múltiples beneficios, disminuye la producción de A β al reducir la proteína APP, el bloqueo de ACAT1 promueve la biogénesis de lisosomas mediada por autofagia para mejorar la depuración de A β ₄₂ en la microglía. Además aumenta la autofagia en neuronas y promueve la degradación de tau antes de que se hiperfosforile (23). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que podrían inhibir otras enzimas de la familia MBOAT, generando efectos indeseables, por ejemplo el inhibidor CI-976 mostró que inhibe múltiples pasos del transporte de membrana, en parte al inhibir la actividad enzimática de lisofosfolípido aciltransferasa 3 (91). Una segunda consideración para el uso de los inhibidores es que son compuestos muy hidrofóbicos y pueden ser secuestrados en la bicapa lipídica, pudiendo alcanzar una concentración local alta, afectando las propiedades biofísicas de la membrana. Los efectos a corto y largo plazo de estos compuestos en el sistema nervioso central no están claramente establecidos (23).

Tabla 1. Resumen de los principales resultados y aportaciones de los estudios con inhibición de ACAT1

Nombre y ref	Modelo	observación	Principal contribución
CP-113,818 y Dup128	Modelo <i>in vitro</i>	Efecto máximo con 10 μ M de CP-113,818, aumento de CL (~42%) y disminución de EC (~45%). Ambos disminuyen $A\beta_{total}$ y $A\beta_{42}$ de forma dependiente de la concentración.	Los niveles en EC están correlacionados con los niveles de $A\beta$ y la actividad de ACAT modula directamente la generación de $A\beta$ a través de la generación de EC (72).
CP-113,818	Modelo <i>in vitro</i> y murino con sobreexpresión de hAPP ₇₅₁ . 60 días de administración con biopolímero de liberación modificada	Se reduce la acumulación de placas de $A\beta$ en un 88-99% y de EC cerebral en un 86%. El aprendizaje espacial se mejora ligeramente y se correlaciona con la disminución en los niveles de $A\beta$.	Se sugiere que el uso de un biopolímero con liberación controlada de un inhibidor de ACAT puede ser considerada como una potencial estrategia para el tratamiento y prevención de EA (73).
Knockdown de ACAT1	Knockdown de la expresión de ACAT1 mediante RNAi	Con 3 μ g de siRNA, disminuyeron 54.4% (p=0.007) los niveles de ACAT1, 21.6% (p<0.001) los EC, 48.4% (p=0.002) APP-C99, 27.4% (p=0.004) APP-C83, 39.2% (p=0.003) $A\beta$ y 27.8% (p=0.024) $A\beta_{42}$.	Los resultados sugieren que RNAi ACAT1 afecta los niveles de α -, β -, y γ -secretasa, $A\beta$, APP-C99 y APP-C83. Se propone que la inhibición farmacológica y mediante ACAT1 RNAi actúan por la misma vía o por una similar (74).
CP-113-818 and CI-1011	Modelo murino con sobreexpresión de hAPP ₇₅₁	La disminución de APP maduro contribuye a la reducción de la generación de $A\beta$	Se propone que los inhibidores de ACAT limitan la disponibilidad de APP maduro para generar $A\beta$, modulando el tráfico de APP en fases tempranas de la vía secretora (75).
Inhibición genética	Inhibición genética en ratón triple transgénico (3XTg-AD)	Reducción mayor al 60% en hAPP, en sus fragmentos proteolíticos y disminución de déficit cognitivo. Causa un aumento de 32% de 24-OHC (p=0.007), el contenido de HMGR disminuyó 65% (p=0.001), y 13% el contenido de CL (p=0.04).	Se propone que la inhibición aumenta el sustrato de CYP46A1, aumenta el 24-OHC, ocasionando una rápida regulación negativa de hAPP, quizá por la aceleración de la velocidad de degradación en el RE. Además, el 24-OHC, puede provocar una regulación negativa de HMGR y de la biosíntesis de colesterol, provocando la reducción de CT en los cerebros de los ratones (76).

CI-1011 Avasimibe	Ratones transgénicos hAPP, de 6.5 y de 16 meses. Tratamiento por 2 meses con un biopolímero de liberación modificada.	En ratones jóvenes CI-1011 disminuyó la carga amiloide en la corteza y en el hipocampo y redujo los niveles de A β ₄₀ en 14% (p=0.019), A β ₄₂ en 26% (p<0.001) y fragmento C-terminal de APP. En ratones viejos con patología amiloide pre-existente, parece reducir la placa difusa, pero no tuvo efecto en los niveles de A β en plasma.	Los inhibidores de ACAT pueden reducir el amiloide difuso mediante una disminución en la generación y un aumento en la depuración de A β (77).
Inhibición genética	Knockdown genético en modelo murino de EA mediante AAV	La terapia disminuye los niveles de A β cerebral y hAPP a niveles similares a la completa inhibición genética de <i>ACAT1</i> .	Proporciona evidencia de que AAV liberado en un área clave del cerebro puede tener efectos en la actividad de ACAT y el fenotipo de EA. Justifica futuras investigaciones para el tratamiento de EA con terapia génica de knockdown (78).
K604 e inhibición genética	Modelo <i>in vitro</i> y murino con Knockout genético de <i>ACAT1</i>	Tanto la inhibición farmacológica como la genética incrementan la degradación de A β ₄₂ y promueven la proteólisis lisosomal de A β ₄₂ .	El bloqueo puede promover la autofagia independientemente de mTOR para activar la red coordinada de expresión y regulación lisosomal, por lo que podría tratarse de una nueva ruta en beneficio de varias enfermedades neurodegenerativas (79).
K604	Modelo <i>in vitro</i> y en ratones triple transgénico (3XTg-AD)	Se incrementa la autofagia en células neuronales y disminuye la proteína P301L-tau. <i>In vivo</i> , disminuye el contenido de P301L-tau en el cerebro de ratones jóvenes, pero no en los ancianos.	El bloqueo de ACAT de disminuir la carga A β , puede tener efectos en la reducción de la proteína tau en etapas tempranas (80).

24-OHC: 24-hidroxicolesterol; APP: Proteína precursora de amiloide; AVV: Virus adeno-asociados; CL: Colesterol libre; CT: Colesterol total; EC. Ésteres de colesterol; HMGR: Hidroximetilglutaril reductasa; RE: Retículo endoplásmico

2.5.1 Mecanismo propuesto del efecto del bloqueo de ACAT1 en demencia

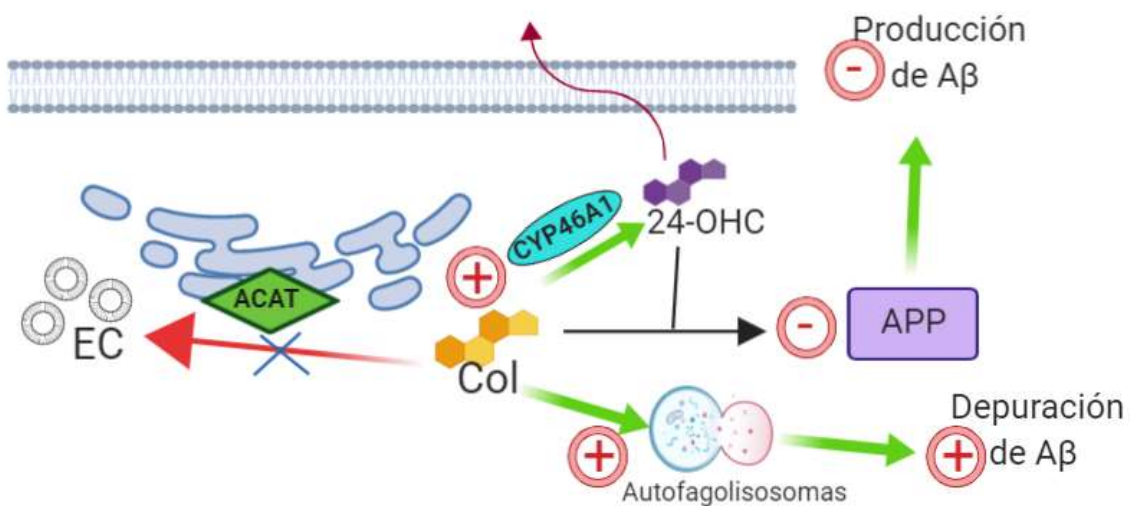
Un posible mecanismo (figura 1) consistente con la reducción de la patología A β y las alteraciones cognitivas es que el exceso de colesterol libre en el cerebro resultado de la supresión de ACAT1 provoca una regulación negativa de APP y además, al incrementarse el sustrato de CYP46A1, el colesterol es convertido en 24-OHC, posteriormente el 24-OHC cruza la barrera hematoencefálica para llegar a la periferia, lo que conduce a la reducción de niveles de colesterol en el cerebro (81). Además de disminuir la producción de A β al reducir la proteína APP, es probable que el bloqueo de ACAT1 también estimule su depuración (23). La microglía, es el tejido macrofágico residente en el SNC y desempeña un papel importante en la depuración de A β en el cerebro, se ha demostrado que la depuración microglial alterada de A β participa en la patogénesis de EA (92,93). Shibuya y colaboradores (79) mostraron en un modelo *in vitro* e *in vivo* que el bloqueo genético de ACAT1 en ratones incrementa la fagocitosis de A β_{42} y estimula su degradación lisosomal. La autofagia, también llamada macroautofagia, es un proceso de degradación celular, en donde una estructura de doble membrana, denominada autofagosoma, engloba componentes citosólicos, incluyendo proteínas/péptidos desnaturalizados y/o propensos a agregación, tales como A β , y se fusiona con los lisosomas para degradar el contenido secuestrado, formando autofagolisosomas (23).

La autofagia puede ser inducida por la inhibición de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), que es una cinasa de serina-treonina que regula la homeostasis celular, el crecimiento y la proliferación (94). El factor de transcripción EB (TFEB), promueve la transcripción de genes diana relacionados con la expresión y regulación lisosomal, coordinando la biogénesis de lisosomas y la autofagia. La inhibición de mTOR activa la vía de señalización de TFEB para promover la formación de autofagosomas y la biogénesis de lisosomas (23). En un modelo *in vitro* con el inhibidor K-604 y con inhibición genética se observó un incremento en

la autofagia y la biogénesis de lisosomas mediada por TFEB, de una forma independiente de mTOR (79).

Se ha reportado que ACAT1 está localizada en mayor proporción en la membrana del RE asociado a mitocondria (MAM) comparado con el RE y las mitocondrias (95). MAM puede servir como plataforma para la formación de autofagosomas, y es posible que el bloqueo de ACAT1 pueda modificar el contenido de colesterol en MAM, lo cual provocaría un incremento en la formación de autofagosomas y un aumento en el volumen lisosomal. Además, el incremento de contenido de colesterol en los autofagosomas puede promover la fusión de membranas entre autofagosomas y lisosomas.

Figura 1. Potencial mecanismo en la supresión de ACAT1



Potencial mecanismo consistente con la reducción de la patología A β , resultado de la supresión de ACAT1. El bloqueo incrementa los niveles de colesterol, sustrato de CYP46A1, por lo tanto, el 24-OHC también aumenta, se disminuye la producción de A β por la reducción de APP, además el incremento del contenido de colesterol puede promover la fusión de membranas entre autofagosomas y lisosomas y aumentar la depuración de A β . A β : Beta Amiloide; ACAT: acil-CoA: colesterol aciltransferasa; EC: ésteres de colesterol; Col: Colesterol; 24-OHC: 24-hidroxicolesterol; APP: Proteína precursora de amiloide.

2.6 En busca de un tratamiento

Existen dos clases de fármacos aprobados para el deterioro cognitivo: los inhibidores de colinesterasas (ICE) y los antagonistas del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (96,97), aunque no proporcionan una cura, su propósito es estabilizar el estado cognitivo y funcional, con el beneficio secundario de reducir potencialmente los problemas de comportamiento asociados con la demencia (97). El déficit colinérgico que caracteriza a la EA proporciona una razón para el uso de ICE, la acetilcolina es utilizada por las neuronas colinérgicas, involucradas en procesos de memoria, aprendizaje, atención y respuesta al estrés. En el caso de EA, se ha mostrado que junto con la reducción de la transcripción de acetiltransferasa de colina (enzima que sintetiza acetilcolina), la acetilcolinesterasa puede interactuar con A β y contribuir al progreso de la enfermedad (98). Los ICE actúan por la unión reversible e inactivación de la acetilcolinesterasa, incrementando el tiempo que el neurotransmisor acetilcolina permanece en el espacio sináptico (97). Existen tres medicamentos aprobados bajo la categoría de ICE, donepezilo, galantamina y rivastigmina (97,99), tienen efectos modestos y temporales en la mejora de la función cognitiva en pacientes con EA (99); existe muy poca evidencia que sugiera que estos medicamentos realmente pueden retardar el progreso y está claro que no previenen el desarrollo de demencia (96). Sin embargo, sus beneficios reales y potenciales pueden extenderse más allá de lo cognitivo, ya que, al reducir la descomposición de la acetilcolina, aumentan la actividad colinérgica de forma central y periférica (99).

En general, los ICE son empleados fuera de indicación para tratar otras formas de demencia como la DVa, la demencia mixta y con cuerpos de Lewy (97,99). Sus efectos adversos son generalmente leves y transitorios, aparecen aproximadamente en 20% de los pacientes y principalmente son efectos gastrointestinales, como diarrea, náuseas y vómito, aunque también puede ocurrir bradicardia y pérdida de peso (97,100).

En el caso del antagonista del receptor NMDA, memantina, fue aprobado por la FDA a finales de 2003 para EA moderada a severa, es un antagonista no competitivo del

receptor NMDA con moderada afinidad, puede proteger contra la sobreestimulación de estos receptores, presente en EA, así como la consiguiente neurotoxicidad mediada por glutamato y calcio (101). En revisiones sistemáticas (102,103) se ha reportado que tiene un pequeño efecto benéfico pero clínicamente detectable en la cognición de pacientes con EA moderado a severo, y aunque en general es bien tolerado, se pueden observar efectos como mareos, dolor de cabeza, confusión e ideas delirantes.

La terapia combinada de memantina e inhibidores de colinesterasa ha mostrado que provee un efecto benéfico adicional en pacientes con EA (104,105). La farmacoterapia prescrita debe ser evaluada periódicamente y debe considerarse la discontinuación cuando la demencia ha avanzado a tal punto que el paciente es totalmente dependiente para todas las actividades de la vida diaria y la preservación del estado cognitivo y funcional ya no es alcanzable, además de considerar los efectos adversos (97).

Se están investigando nuevos tratamientos y estrategias terapéuticas con el objetivo de frenar el curso de la enfermedad, estos nuevos tratamientos consideran la complejidad neuropatológica y algunos están dirigidos a múltiples dianas y con la intención de ser administrados en fases iniciales de la enfermedad, para mejorar la eficacia de estos tratamientos será necesario desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico para identificar el padecimiento de manera temprana o incluso que se permita predecir el desarrollo de este (106). Gran parte de la investigación se ha centrado en terapias directamente dirigidas contra A β , principalmente inmunoterapias, otras dirigidas para disminuir la producción de A β , mediante la inhibición de β - y γ - secretasa, y también terapias directamente contra la proteína tau (107). Los fracasos de las inmunoterapias con A β aumentan el cuestionamiento de que si este blanco es el adecuado para el tratamiento eficaz de EA (108).

También han sido de utilidad los estudios genéticos, los cuales han dirigido hacia el estudio de nuevas vías de la patogénesis, y que están siendo exploradas en modelos celulares y animales, pretendiendo llegar a la identificación de nuevos blancos terapéuticos (109). La evidencia genética ha señalado las mutaciones en

APP y las enzimas que escinden A β de APP, como sustanciales para la participación de A β en la patogénesis de EA (108).

Una de las vías relacionadas que se ha logrado identificar ha sido, la del metabolismo de los lípidos, y a pesar de que una gran cantidad de estudios conectan el metabolismo de los lípidos con la patogénesis de EA y lo relacionan con DVa, existen pocos enfoques terapéuticos que exploten esta conexión, con la excepción de los fármacos que afectan el metabolismo del colesterol, como las estatinas y los inhibidores de ACAT1 (2).

Debido a la relación del colesterol con la demencia, se ha observado el efecto de los inhibidores de la biosíntesis de colesterol, las estatinas, y parecen disminuir la generación de APP, la secreción neuronal de A β y la síntesis *de novo* de colesterol (24). Estudios epidemiológicos muestran que la prevalencia del diagnóstico de EA y DVa es menor entre las personas que consumen estatinas que entre las que no (110–112). Las estatinas son útiles en la prevención de ocurrencia y recurrencia de eventos vasculares, estos efectos están relacionados con su capacidad para reducir las lipoproteínas de baja densidad y otros efectos farmacológicos como sus efectos anti-inflamatorios, antioxidantes, la inhibición de la agregación plaquetaria, la mejora de la perfusión sanguínea y sus propiedades neuroprotectoras (113), lo cual puede reducir la incidencia de demencia posterior al accidente cerebrovascular (6).

Los resultados de estudios observacionales y ensayos clínicos aleatorizados han mostrado resultados contradictorios (110,114–119) y aunque diversos estudios observacionales han sugerido un papel beneficioso de las estatinas en la prevención de demencia debido a que no existe evidencia suficiente no se recomiendan para prevenir el deterioro cognitivo o demencia (119).

2.7 Farmacogenética de los blancos terapéuticos

Se estima que sólo del 20-30% de los pacientes con demencia responden apropiadamente a los medicamentos convencionales, esta respuesta variable se debe, en gran medida, a factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Uno de los problemas asociados es que los aspectos moleculares de la patología aún no han sido completamente dilucidados, por lo que los blancos terapéuticos pudieran no ser los apropiados para la real etiología de la enfermedad, además la mayoría de los tratamientos son sintomáticos, pero no anti-patogénicos, aunado a que los componentes genéticos están pobremente definidos y por lo tanto el entendimiento de las interacciones fármaco-genética es muy limitado. Para lograr una optimización de la terapéutica, se requieren considerar varios aspectos como: el costo de los medicamentos, un enfoque multifactorial a los desórdenes crónicos, implementar nuevas terapias que aborden factores causales y establecer estrategias farmacogenéticas en el desarrollo de fármacos (120), la farmacogenética puede ser útil para mejorar la eficacia en los estados tempranos del desarrollo de fármacos (121).

La farmacogenética es el estudio de la respuesta farmacológica del individuo según su genotipo, y trata de identificar variantes genéticas que influyen en la respuesta terapéutica de los fármacos. Esta disciplina ofrece la oportunidad de, con base en el perfil genético del paciente, orientar sobre cuales terapias farmacológicas pueden ser más eficaces y con menos efectos adversos antes de ser administradas (122). Las terapias personalizadas basadas en perfiles genómicos implican la caracterización de 5 tipos de grupos de genes: los asociados con la patogénesis de la enfermedad; genes asociados con el mecanismo de acción de los medicamentos; los asociados con el metabolismo de fármacos (fase I y fase II); los asociados con transportadores de fármacos; y los genes pleiotrópicos involucrados en cascadas y rutas metabólicas (120).

Los avances científicos y tecnológicos han permitido incrementar la identificación y el conocimiento sobre variantes comunes y raras que contribuyen al riesgo de demencia y han generado nuevas oportunidades para entender los mecanismos

implicados en el padecimiento, esto puede contribuir al diagnóstico y directamente al tratamiento (123).

Cacabelos (121), propone que la primera etapa en el curso natural de eventos técnicos para lograr metas eficientes en farmacogenética y farmacogenómica es la identificación de genes mutantes y/o variantes polimórficas de riesgo. Tanto en EA como en DVa, el estudio de los factores genéticos ha ido en aumento, en un inicio los estudios se realizaban con pocos polimorfismos genéticos, pero actualmente se han introducido estudios de asociación de genoma completo.

Los polimorfismos, son la base natural de la variabilidad genética dentro de una misma especie y se les denomina de esta forma cuando una mutación esta presente en la población con una frecuencia igual o mayor al 1%, Existen distintos tipos de polimorfismos en el genoma humano pero los más frecuentes son los polimorfismos de nucleótido único (SNPs o snips), que se refieren al cambio en una sola base o nucleótido (124).

Los SNPs alteran la regulación de la expresión de un gen o pueden tener la capacidad de cambiar la secuencia de aminoácidos que forman una proteína, de manera específica en cada persona, lo cual, además de explicar la individualidad humana, se ha observado que confiere también susceptibilidad o resistencia a enfermedades comunes, así como variabilidad en la respuesta a medicamentos de uso común (125).

La EA tiene un fuerte componente genético, sin embargo, la susceptibilidad individual es poco clara debido a su complejidad genética (126). En los últimos años se han investigado más de 3 mil genes relacionados con EA (120,127). Pese a la cantidad de estudios realizados y el número de genes estudiados, Ridge y colaboradores (128) estimaron que en total el 33% del total de la varianza fenotípica se explica por los SNPs comunes. *APOE* solo explica el 6% y otros marcadores conocidos el 2%, lo que significa que más del 25% de la varianza fenotípica no se ha logrado identificar con los marcadores comunes, sin embargo, está dada por SNPs comunes incluidos en arreglos de genotipado. En general, mutaciones en 3 genes, APP, presenilina 1 (PS-1) y presenilina 2 (PS-2) se han relacionado con EA de inicio temprano de características autosómico dominante, juntos suman el 40%

de los casos de EA de inicio temprano (129,130). En EA de inicio tardío, el cual suma el 95% de los casos, es el alelo $\epsilon 4$ de *APOE* el que ha sido genéticamente ligado a EA (129).

Los estudios realizados se han centrado en genes relacionados con vías que se sabe son importantes en la patogénesis, como el metabolismo de los lípidos. Los genes involucrados en el metabolismo lipídico tienen una importante función en el cerebro; por lo tanto, los polimorfismos presentes en estos genes pueden tener un efecto importante en el funcionamiento del cerebro (123,126). Algunos de los genes involucrados en el metabolismo lipídico y que se han incluido en estudios de GWAS son *APOE*, *CLU*, *ABCA7*, *SORL1*, entre otros (126).

Debido a la función que cumple *ACAT1* en la homeostasis del colesterol en el cerebro, se ha supuesto que las modificaciones en la actividad enzimática podrían estar relacionadas con el inicio o progreso de EA. Los primeros estudios en investigar la posible relación, fueron estudios de asociación genética con SNPs y su relación con la presencia de EA (tabla 2), sin embargo, mientras algunos estudios reportan una asociación significativa (61,131), otros estudios no la encontraron (132,133). Con el avance de la tecnología, fue posible analizar múltiples polimorfismos en un gran número de participantes, lo que considera las características multifactoriales y multigenéticas de la enfermedad, lo cual podría proporcionar una mejor aproximación, *ACAT1* ha sido incluido en estudios (123,134–137) donde la asociación fue investigada en un grupo de polimorfismos en genes involucrados en toda una vía metabólica, sin obtener resultados definitivos.

Tabla 2. Estudios de asociación genética entre ACAT1 y EA

Población	n	SNPs	Resultados
Suiza, Alemania, Grecia e Italia	309 pacientes con EA / 356 controles	rs1543876 rs2152318 rs1044925	Genotipo A/A de rs1044925 fue asociado con riesgo reducido de EA (OR=0.6, IC95%=0.4-0.8), baja carga amiloide cerebral (p=0.03), sin impacto en NFT (p=0.280). Disminución del 40% en el nivel de colesterol en CSF de los portadores de A/A comparado con los no portadores, (0.46±0.17 vs 0.76±0.26 mg/dl, p=0.005). Los resultados sugieren que el genotipo puede estar asociado con actividad reducida de ACAT1. No hubo asociación de rs2152318 (p=0.9) ni de rs1543876 (p=0.5) (131).
Población del norte de China	107 pacientes con EA / 118 controles	rs1044925	Parece no haber asociación entre rs1044925 y el riesgo de EA esporádico (OR 0.94, IC 95%=0.48–1.86). Frecuencia del alelo fue diferente comparado con otras poblaciones (132).
Muestras de NIMH y CAG	NIMH: 440 afectados y 348 no afectados. CAG: 154 afectados y 180 no afectados	rs2493117 rs2256282 rs1543876 rs2152318 rs2152320 rs2152319 rs3753526 rs1044925	Las muestras de NIMH revelaron una tendencia hacia la asociación en inicio "temprano / mixto" (P = 0.06), no se observa evidencia de asociación en la muestra CAG (P = 0.7). Ninguno de los análisis de haplotipos reveló señales significativas. Este análisis no soporta una contribución clínicamente relevante de las variantes genéticas en ACAT1 sobre el riesgo de EA (133).
Finlandia	410 pacientes con EA / 455 controles	rs2247071 rs2862616 rs3753526 rs1044925	Genotipo C/C de rs2247071 aumenta el riesgo para EA (OR=1.38, IC95%= 1.01–1.89; p=0.043), no se encontró relación significativa en los niveles de Aβ ₄₂ , tau y ptau. No hubo asociación de rs2862616, rs3753526 y 1044925 con EA (61).

*The National Institute of Mental Health

**Consortium on AD Genetics

En el caso de la DVa, a pesar de que es el segundo tipo de demencia más común, hasta hoy, poco se sabe de la contribución de los polimorfismos al riesgo de DVa. Los estudios que se han realizado se han centrado en polimorfismos que han sido encontrados como factor de riesgo de otras demencias, en particular para EA. Sin embargo, debido a resultados controversiales, la genética de DVa continua siendo poco clara (19). Se ha buscado asociación de *APOE* con DVa, y mientras algunos estudios sugieren una asociación entre *APOE4* y DVa (19,20,138,139) otros reportan que no han encontrado tal asociación (140,141). El alelo $\epsilon 2$ que para EA se ha presentado como factor protector, en el caso de DVa también presenta resultados contradictorios (19,21,139). Otros genes que se han investigado y reportados como modificadores del riesgo para desarrollar DVa son *APOE* (19,21,139), *MTHFR* (19,21,139), *PON1*, *TGF- β 1*, y *TNF- α* (19).

3. Justificación

La demencia es un problema prioritario de salud pública debido a su alta prevalencia a nivel mundial, y por su impacto a nivel económico, de salud y social, por el estigma y exclusión asociados.

Aunque diversos fármacos son empleados para estabilizar el estado cognitivo y funcional, con el beneficio secundario de reducir potencialmente los problemas de conducta asociados, no existe una cura y a pesar de realizar un tratamiento integral correcto, los pacientes evolucionan hasta una fase terminal de la enfermedad, donde se debe plantear una limitación terapéutica, por lo que continuar con la búsqueda de nuevos medicamentos y la identificación de blancos terapéuticos es tema prioritario. En este sentido, los estudios farmacogenómicos pueden ser útiles en la identificación y validación de nuevas dianas farmacológicas, uno de los primeros pasos en este proceso, es la identificación de variantes polimórficas de riesgo. Por ello es importante realizar estudios para identificar las variantes que modifican la susceptibilidad de un individuo para desarrollar demencia. En este caso, se ha señalado la relación que tiene un metabolismo alterado del colesterol en el desarrollo de demencia, y de la participación de la enzima ACAT1 en el metabolismo del colesterol en el cerebro, también se ha documentado que algunos polimorfismos genéticos en esta enzima sugieren una actividad enzimática alterada por lo que podrían generar una modificación en la susceptibilidad. Realizar este tipo de estudios en población mexicana, permiten, en primera instancia conocer la frecuencia de los polimorfismos en nuestra población, y determinar el riesgo de estos, considerando otros factores.

Sumando en los esfuerzos por comprender el complejo de modificaciones genéticas que, en conjunto, se asocian a una mayor susceptibilidad de presentar una patología, que posteriormente podría dirigirse a la propuesta de nuevos blancos terapéuticos o a la identificación de tratamientos con mayor probabilidad de éxito.

4. Planteamiento del problema

El colesterol es una molécula lipídica esencial, presente en las membranas celulares de los mamíferos, sin embargo, los niveles anormales altos, son dañinos para las células. En estudios epidemiológicos se han identificado niveles altos de colesterol como un factor de riesgo para presentar EA y para los desórdenes cardiovasculares relacionados con el desarrollo de DVa. A nivel celular, la homeostasis del colesterol está altamente regulada por diversos mecanismos de control, la enzima ACAT1 tiene una importante función, al prevenir la sobreacumulación de colesterol libre en las membranas celulares, formando ésteres de colesterol a partir de colesterol libre, el equilibrio entre el colesterol libre y sus ésteres es un punto clave en el control de la amiloidogénesis, ya que se ha observado que los niveles crecientes de ésteres de colesterol potencian la liberación de A β en células cultivadas, mientras que la inhibición farmacológica o genética de *ACAT1* conduce a la reducción de ésteres y de A β .

Los polimorfismos genéticos presentes en los genes que codifican enzimas pueden generar falta, reducción o incremento en su actividad enzimática, lo que puede relacionarse con un cambio en la susceptibilidad para presentar una enfermedad. Identificar genes y/o variantes polimórficas de riesgo es la primera etapa en la lista de sucesos técnicos para lograr metas eficientes en farmacogenética y farmacogenómica. No se ha logrado establecer la importancia de los polimorfismos de *ACAT1* en el desarrollo de algún tipo de EA o de DVa y en población mexicana no existe información sobre la frecuencia de los polimorfismos de este gen, ni de la asociación entre estos y la presencia de la enfermedad. Estas consideraciones fundamentan el interés e importancia de la realización del presente estudio.

4.1 Pregunta de investigación

¿Los polimorfismos presentes en *ACAT1/SOAT1* están asociados a la presencia de la EA y otras demencias en población mexicana?

5. Objetivos

- Objetivo general

Investigar la asociación de los polimorfismos del gen *ACAT1* con la susceptibilidad genética para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias en población mexicana y analizar teóricamente su posible aplicación como blanco terapéutico

- Objetivos específicos

- Conocer la frecuencia de las variantes alélicas y genotípicas de los sitios polimórficos rs1044925, rs2247071, rs2862616, rs3753526 en el gen *ACAT1* en el grupo de pacientes mexicanos con demencia y en el grupo control
- Investigar la asociación existente entre las variantes genéticas y la presencia de demencia
- Analizar los modelos de herencia de los sitios polimórficos asociados y construir modelos incluyendo las variables socio-demográficas, clínicas y de estilo de vida
- Determinar el desequilibrio de ligamiento (DL) entre los diferentes polimorfismos estudiados y obtener los haplotipos correspondientes
- Explicar, teóricamente, la relación entre los polimorfismos estudiados y los inhibidores de *ACAT1* y su posible aplicación como blanco terapéutico para demencia.

6. Métodos

6.1 Diseño del estudio

Tipo de estudio: Casos y controles

6.2 Población

Población de estudio: Los datos del presente estudio se obtuvieron del Estudio sobre el envejecimiento y la demencia en México (SADEM), realizado de septiembre de 2009 a marzo de 2010, el cual consiste en una cohorte con 3105 pacientes, que representan una muestra aleatoria de la población de 60 años o más, beneficiarios (usuarios y no usuarios) de las 24 unidades de medicina familiar del IMSS ubicadas en la Ciudad de México. El objetivo del estudio original fue conocer la prevalencia de la demencia en México (142).

6.3 Calculo del tamaño de la muestra

Aunque se incluyeron todos los pacientes diagnosticados con algún tipo de demencia que participaron en el SADEM, se realizó el cálculo del tamaño de la muestra estimado a partir del supuesto de que el polimorfismo con menor frecuencia reportada se presenta en un 11% para el alelo G del sitio polimórfico rs3753526, con una potencia estadística de 0.80, un nivel de significancia fijado en 0.05 (unilateral), esperando 20% de participantes como perdida en el estudio. Así tenemos que sería necesario incluir a 315 participantes por grupo. Se utilizo la siguiente fórmula (143).

$$n = \frac{[Z_{\alpha}\sqrt{2\hat{p}\hat{q}} + Z_{\beta}\sqrt{p_1q_1 + p_0q_0}]^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

$$q_0 = 1 - p_0 \quad \hat{p} = \frac{1}{2}(p_1 + p_0) \quad \hat{q} = 1 - \hat{p} \quad p_1 = \frac{p_0R}{1+p_0(R-1)} \quad q_1 = 1 - p_1$$

En donde:

Z_{α} = 1.96 que corresponde a una probabilidad de error tipo alfa de 5%

Z_{β} = 0.84 que corresponde a una probabilidad de error beta de 20%

p_0 = Frecuencia esperada de la exposición de interés (0.11)

R = razón de momios esperada en la asociación. OR = 2

6.4 Criterios de selección

- Criterios de inclusión

- Hombres o mujeres de 60 años o más
- Derechohabientes del IMSS, usuarios o no usuarios
- Qué sean mexicanos mestizos, que significa que tres generaciones, incluyendo la suya hayan nacido en México

- Criterios de exclusión para casos

- Con problemas conductuales graves, delirium y/o alucinaciones
- Con cualquier otro tipo de tratamiento psicológico
- Con alguna cirugía neurológica

- Criterios de exclusión para controles

- Con problemas conductuales graves, delirium y/o alucinaciones
- Con cualquier otro tipo de tratamiento psicológico
- Con alguna cirugía neurológica
- Con antecedentes familiares de demencia
- Con algún síntoma conductual como depresión o ansiedad.

- Criterios de eliminación
 - Muestra de ADN insuficiente o de mala calidad para realizar el análisis genético
 - Con encuestas incompletas

- Criterios de selección de casos y controles

Casos	Controles
Pacientes diagnosticados con alguna forma de demencia, EA, DVa o mixta (EA/DVa)	Participantes con diagnóstico negativo de algún tipo de demencia

6.5 Variables

- Variable dependiente

- Demencia

Definición conceptual: Es un síndrome caracterizado por el deterioro de la función cognitiva más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal. Es causada por diversas enfermedades y lesiones, como la EA o los accidentes cerebrovasculares (1).

Definición operacional: Se diagnóstico de acuerdo a los criterios para demencia (DMS-IV-R 2000 y NINCDS-ADRDA (144) y del NINDS-AIREN (8)).

La enfermedad de Alzheimer fue diagnosticada como probable, el diagnóstico de DVa se realizó en 2 pasos: 1) diagnóstico de demencia y 2) asociación de demencia a lesiones de origen vascular. El criterio para diagnóstico de demencia mixta (EA/DVa) fue que el curso de la enfermedad fuera sugestivo de EA y que el paciente tuviera síntomas neurológicos que sugerían isquemia (145).

- Variables independientes

➤ Polimorfismo genético

Definición conceptual: Son cambios en el ADN, que pueden ser originados por errores en los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como por factores ambientales, y que tienen una frecuencia igual o mayor al 1% en la población (124).

Definición operacional: Los polimorfismos de nucleótido único fueron determinados utilizando PCR en tiempo real con sondas TaqMan® en el equipo Vii7.

Tabla 3. Polimorfismos estudiados

Polimorfismo	Localización	Cambio de base	Cambio de base
rs2247071	Intrón	C/T	
rs2862616	Intrón	A/G	
rs3753526	Éxon	C/G	L[CTC]>L[CTG]
rs1044925	3'UTR	A/C	

➤ Genotipo.

Definición conceptual: Es la pareja de alelos observada en un individuo. Un alelo es cada posible variante de un polimorfismo (125).

Definición operacional: Con la determinación de los polimorfismos presentes en cada individuo, se clasificarán como homocigotos para el alelo con mayor frecuencia, homocigotos para el alelo de menor frecuencia o heterocigotos cuando el polimorfismo sólo esté presente en un alelo. En la tabla 4, se especifican los posibles genotipos para cada polimorfismo.

Tabla 4. Genotipos para cada polimorfismo

Polimorfismo	Genotipos
rs2247071	CC/TT/CT
rs2862616	CC/TT/CT
rs3753526	CC/GG/CG
rs1044925	AA/CC/AC

En la tabla 5 se incluyen las variables clínicas, sociodemográficas y de hábitos consideradas en el estudio.

Tabla 5. Variables clínicas y sociodemográficas

Variable	Definición conceptual	Definición operacional
Edad	Número de años transcurridos desde el nacimiento hasta el momento en el que el participante ingreso al estudio.	Mediante interrogatorio directo al paciente y considerando fecha de nacimiento.
Sexo	Conjunto de características fisiológicas y anatómicas que definen a los seres humanos como hombre y mujer.	Por interrogatorio directo al momento de la entrevista y observación de los pacientes.
Nivel de educación	Número de años que el paciente asistió a la escuela	Obtenido por entrevista directa con el paciente
Índice de masa corporal (IMC)	Es una razón matemática que asocia la masa y la talla de un individuo.	Se calculó dividiendo el peso del paciente por el cuadrado de su altura (Kg/m ²) (146)
Glucosa	Concentración de glucosa en plasma.	Determinación mediante método enzimático.
Colesterol total	El CT es la suma del colesterol transportado en las partículas de LDL, HDL y otras lipoproteínas.	Determinación mediante método enzimático
Colesterol-HDL	Es el colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad, transportan el colesterol de otras partes del cuerpo al hígado.	Determinación mediante método enzimático
Colesterol-LDL	Es el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad, que lo transportan a las células.	El C-LDL fue calculado con la fórmula de Friedewald modificada por De Long
Triglicéridos	Es un tipo de lípido, relacionado con una alimentación alta en grasas saturadas o carbohidratos.	Determinación mediante método enzimático
Grasa corporal	Es la masa total de grasa dividida por la masa corporal total, multiplicada por 100; la grasa corporal incluye grasa corporal esencial y grasa corporal de almacenamiento.	Mediante bioimpedancia eléctrica.
Área de grasa visceral	Es el área estimada de grasa alrededor de los órganos internos del abdomen. Para estar sano se recomienda mantener un área visceral menor de 100 cm ² .	Mediante bioimpedancia eléctrica.

Índice de comorbilidad de Charlson	Relaciona la mortalidad a largo plazo con la comorbilidad del paciente, se utiliza como un indicador de comorbilidad.	Mediante un instrumento validado.
Hipertensión	Es una enfermedad crónica en la que aumenta la presión con la que el corazón bombea sangre a las arterias.	Mediante diagnóstico médico, cifras de presión sistólica de sangre arriba de 140 mmHg o diastólica por arriba de 90 mmHg
EVC	Alteración en las neuronas, que provoca disminución de flujo sanguíneo en el cerebro acompañada de alteraciones cerebrales de manera momentánea o permanente.	Por interrogatorio directo al paciente.
Diabetes mellitus tipo 2	Enfermedad cónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando no se utiliza eficazmente.	Mediante interrogatorio directo al paciente.
Hábito de fumar	Se consideró como fumadores aquellos que refirieron haber consumido más de 100 cigarros a lo largo de su vida.	Por entrevista directa al paciente
Consumo de alcohol	Los sujetos se definieron como bebedores ligeros / moderados si no habían consumido más de dos bebidas al día durante al menos 6 meses. Aquellos que nunca bebieron o bebieron de vez en cuando y que no cumplieron con los criterios para bebedores ligeros / moderados se consideraron abstinentes. Los sujetos que habían consumido más de dos bebidas al día durante más de 6 meses se consideraban bebedores intensos	Por entrevista directa al paciente

6.6 Metodología clínica y de laboratorio

Cada uno de los participantes que ingresaran al estudio SADEM fueron visitados en su domicilio por personal previamente capacitado, se les aplicó un cuestionario estandarizado específicamente para el estudio, este cuestionario incluyó variables para la identificación del sujeto, fecha de nacimiento, edad, sexo, nivel de estudios, estado civil, ingresos económicos, antecedentes familiares de demencia; antecedentes de enfermedades crónicas como la diabetes (diagnóstico médico a través de los niveles de glucosa en sangre por arriba de 110 mg/dL), hipertensión (diagnóstico médico a través de las cifras de presión sistólica de sangre arriba de 140 mmHg o diastólica por arriba de 90 mmHg), enfermedades cardíacas (diagnosticadas médicamente), EVC (definido de acuerdo con los criterios de la OMS), otras posibles enfermedades, estos antecedentes fueron evaluados mediante auto reporte utilizando la pregunta si algún médico le había diagnosticado la enfermedad y se corroboró por la administración de tratamiento específico. Para cada una de estas variables se consideró, el tiempo que llevaba con el o los padecimientos y el modo de control ya sea por medicamentos o dieta y el tiempo de iniciado del tratamiento.

En el perfil lipídico (que incluyó triglicéridos, colesterol total, C-HDL y C-LDL) se utilizaron técnicas enzimáticas utilizando un autoanalyzer Hitachi 902 (Boehringer Mannheim), empleando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania y Wako Chemicals, E.U.A). El C-HDL se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). El C-LDL fue calculado con la fórmula de Friedewald modificada por De Long (147).

6.7 Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo a partir de una muestra de sangre periférica por medio de la técnica de expulsión salina (anexo 2), descrita por Lahiri and Numberger (148). Las muestras de ADN se conservaron a -80°C . Se realizó la cuantificación del ADN extraído por medio del espectrofotómetro NanoDrop® 1000 a una longitud de onda de 260 nm y se prepararon diluciones a una concentración de $10\text{ng}/\mu\text{L}$.

6.8 Genotipificación

La genotipificación de los SNPs se realizó mediante PCR en tiempo real en combinación con sondas TaqMan®, se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real ViiA 7, en placas para 384 muestras. Los números de ensayo se muestran en la tabla 6, y los componentes de la reacción y las condiciones en las tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla 6. Polimorfismos y número de ensayo en Thermo Fisher

Polimorfismo	No. de ensayo SNP TaqMan®
rs2247071	C_1805971_10
rs2862616	C_1805887_10
rs3753526	C_27496218_10
rs1044925	C_1805907_10

Tabla 7. Componentes de la reacción de PCR

Componente	Volumen
Master Mix	5 μL
Sonda 40X	0.125 μL
ADN ($10\text{ng}/\mu\text{L}$)	4 μL
Agua	0.75 μL

Tabla 8. Condiciones de la reacción de PCR

Etapa	Temperatura	Duración	Ciclos
Activación de la enzima	95°C	10 minutos	-----
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40
Alineación/extensión	60°C	1 minuto	

6.9 Análisis estadístico

6.9.1 Análisis descriptivo y de asociación

Se analizaron las variables clínicas y demográficas entre los grupos de pacientes con demencia y los controles utilizando Stata v. 12.0. Para las variables con distribución normal se calculó la media y la desviación estándar, y para las que presentaron libre distribución se utilizó la mediana y los percentiles 25 y 75, para identificar diferencias entre ambos grupos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Las variables categóricas se analizaron con la prueba de chi-cuadrada, y los datos se presentaron como frecuencia absoluta y porcentaje, nivel de significancia $p < 0.05$.

En cuanto al análisis genético, las frecuencia alélicas y genotípicas fueron obtenidas por conteo directo. Para evaluar el equilibrio genético en la población de estudio se utilizó el principio de Hardy-Weinberg, empleando la prueba chi-cuadrada o la prueba exacta de Fisher, según correspondía.

Para evaluar la asociación de los polimorfismos con la enfermedad, la diferencia en la distribución de alelos y genotipos entre los pacientes y el grupo control fue evaluado con la prueba de chi-cuadrada o la prueba exacta de Fisher. Se estimó el valor de odds ratio (OR) o razón de momios (RM) con intervalos de confianza del 95% para cada alelo y genotipo entre los 2 grupos.

6.9.2 Modelos genéticos

De acuerdo con el número de copias de cada alelo necesarias para modificar el riesgo conferido, se consideraron cinco modelos de herencia: codominante, dominante, recesivo, heterocigoto y aditivo. Se seleccionó como el mejor modelo al que tuviera el menor valor correspondiente al criterio de información de akaike (AIC). Con el modelo de herencia seleccionado se construyeron modelos logísticos múltiples integrando las variables con relevancia biológica o con significancia estadística, así como las variables potencialmente confusoras.

6.9.3 Haplotipos

Mediante el programa Haploview versión 4.2 se estimó el DL y se construyeron los haplotipos con las variantes polimórficas. Haploview crea varias mediciones de desequilibrio de ligamiento que utiliza para crear una representación gráfica, conocida como mapa de desequilibrio. El DL se refiere a una situación en la que una combinación particular de alelos, en dos loci próximos segregan ligados más frecuentemente de lo que se esperaría debido al azar, dada su frecuencia en la población. Para medir el desequilibrio de ligamiento se empleó el coeficiente de Lewontin (D') multiplicado por 100. Con la información de las frecuencias de cada haplotipo en los casos y los controles se calculó el riesgo de cada uno de ellos para demencia.

7. Aspectos éticos

De acuerdo con el Artículo 17 del Capítulo 1, del Título Segundo del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, el estudio se clasifica como una investigación con riesgo mínimo, ya que los datos se obtuvieron a través de procedimientos comunes y rutinarios.

El estudio cumple con el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud y la Declaración de Helsinki.

Los potenciales participantes fueron seleccionados de la cohorte del estudio SADEM. En el pasado los participantes aceptaron participar en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado, donde se les informó que los resultados serían estrictamente confidenciales. Se les aclaró que se requeriría la toma de una muestra de sangre periférica a la cual se le extraería ADN, aceptaron que sus muestras sanguíneas fueran almacenadas confidencialmente y dieron su autorización para que fueran utilizadas en estudios genéticos posteriores.

8. Resultados

8.1 Características de la población de estudio

El estudio incluyó un total de 400 participantes, 109 pacientes con enfermedad de Alzheimer, 59 con demencia vascular y 28 pacientes con demencia mixta (tabla 9).

El porcentaje total de mujeres fue del 64.5%, sin diferencias significativas entre ambos grupos. En el grupo control la mediana de edad fue de 70 (65-76) años, mientras que en el grupo con demencia fue de 77 (71-83) años ($p < 0.001$).

Al comparar entre los grupos de estudio, los individuos con demencia mostraron un nivel de educación menor (5.71 ± 5.49 vs 6.55 ± 5.09 ; $p = 0.025$), elevación en los niveles de glucosa (112 (95.5-149) vs 97 (90.5-105.5); $p < 0.001$), y de forma general una disminución ($p < 0.05$) en los niveles de las variables relacionadas con la composición corporal como el IMC, la grasa corporal y el área de grasa visceral.

Los episodios de EVC fueron más frecuentes en el grupo de pacientes con demencia (11.73 vs 3.43; $p = 0.002$), en cuanto a los hábitos, tanto fumar como el consumo de alcohol fueron más comunes en el grupo control (38.73 vs 28.72; $p = 0.035$ y 34.80 vs 18.88; $p < 0.001$; respectivamente).

Los niveles de colesterol total, C-HDL, triglicéridos, y el número de participantes con hipertensión y diabetes mellitus no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

Tabla 9. Características generales de los grupos de estudio

Variable	Total (n=400)	Controles (n=204)	Demencia (n=196)	P- valor*
Género, n (H%/M%)	142 (35.50) / 258 (64.50)	74(36.27) / 130(63.73)	68(34.69) / 128(65.31)	0.741
Edad, años	74 (67-80)	70 (65-76)	77 (71-83)	<0.001
Nivel de educación, años	6.14 ± 5.30	6.55 ± 5.09	5.71 ± 5.49	0.025
IMC, kg/m ²	26 (23.55-30)	26.70 (24.40-30.40)	25.60 (23.30-28.90)	0.013
Glucosa, mg/dL	101 (93-126.50)	97 (90.50-105.50)	112 (95.50-149)	<0.001
Colesterol total, mg/dL	203 (180-226)	202 (179.50-226)	204 (182.50-226)	0.822
C-HDL, mg/dL	51 (43-60.50)	51 (42-60)	52 (44.5-61)	0.193
C-LDL, mg/dL	117 (93-138)	120 (96-139)	112 (89-134)	0.039
Triglicéridos, mg/dL	144 (115-192)	144 (114.50-192)	145 (117-191.50)	0.873
Grasa corporal, %	32 (26.6-37.8)	33.9 (26.8-39.1)	31.3 (25.75-36.5)	0.024
Área de grasa visceral, cm ²	138.5 (113-188)	148 (117-202.5)	133 (103-173.5)	0.002
Índice de Charlson	3 (2-4)	2 (2-4)	3 (2-5)	0.002
Hipertensión, n(%)	295 (73.75)	148 (72.55)	147 (75.00)	0.578
Diabetes mellitus tipo 2, n(%)	146 (36.5)	70 (34.31)	76 (38.78)	0.354
EVC, n(%)	30 (7.50)	7 (3.43)	23 (11.73)	0.002
Hábito de fumar, n(%)	135(33.83)	79(38.73)	56(28.72)	0.035
Consumo de alcohol, n(%)	108(27.00)	71 (34.8)	37(18.88)	<0.001

Los datos se muestran como promedio ± desviación estándar o mediana y percentiles 25 y 75, para variables cualitativas se indica el número de individuos y porcentaje, n (%).

*p-valor, fue estimado usando la prueba de U de Mann-Whitney y la prueba de chi-cuadrada para variables cualitativas.

8.2 Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los 4 polimorfismos estudiados (rs2247071, rs2862616, rs3753536 y rs1044925) en el gen *ACAT1* en el grupo control y en el grupo de pacientes con demencia se muestran en las tablas 10 y 11. Las frecuencias de los genotipos observadas y esperadas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

No se observaron participantes en el grupo control portadores del alelo *T*, del polimorfismo rs2247071, y del alelo *A*, de rs2862616, por lo que no fue posible calcular el valor del OR. El alelo *G*, de rs3753536, y el alelo *C*, de rs1044925, tienen una frecuencia mayor en el grupo de participantes con demencia.

Tabla 10. Frecuencia alélica de los polimorfismos

Polimorfismo	Demencia n=196, n(%)	Control n=204, n(%)	OR (IC 95%)*	p- valor
rs2247071	359(91.58) /	408(100) /	-----	-----
C/T	33(8.42)	0(0)		
rs2862616	77(19.64) /	0(0) /	-----	-----
A/G	315 (80.36)	408(100)		
rs3753536	274(69.90) /	333(81.62) /	1.91 (1.37-2.66)	<0.001
C/G	118(30.10)	75(18.38)		
rs1044925	277(70.66) /	334(81.86) /	1.87 (1.34-2.61)	<0.001
A/C	115(29.34)	74(18.14)		

* El riesgo calculado es el correspondiente al alelo de menor frecuencia
OR: Odds Ratio; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%

Tabla 11. Frecuencias y riesgos de los genotipos para cada polimorfismo

Polimorfismo	Genotipo	Casos n=196 n(%)	Controles n=204 n(%)	OR (IC 95%)	p-valor
rs2247071	CC	165(84.18)	204(100)	-----	-----
	CT	29(14.80)	0(0)	-----	-----
	TT	2(1.02)	0(0)	-----	-----
rs2862616	AA	11(5.61)	0(0)	-----	-----
	AG	55(28.06)	0(0)	-----	-----
	GG	130(66.33)	204(100)	-----	-----
rs3753526	CC	99(50.51)	129(63.24)	0.59 (0.40-0.88)	0.010
	CG	76(38.78)	75(36.76)	1.09 (0.73-1.63)	0.680
	GG	21(10.71)	0(0)	-----	-----
rs1044925	AA	101(51.53)	145(71.08)	0.43 (0.29-0.65)	<0.001
	AC	75(38.27)	44(21.57)	2.25 (1.45-3.50)	<0.001
	CC	20(10.20)	15(7.35)	1.43 (0.71-2.88)	0.313

OR: Odds Ratio; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%

8.3 Modelos de herencia

Obtener los valores de riesgo para cada modelo de herencia, no fue posible con los polimorfismos rs2247071 y rs2862616, debido a las frecuencias genotípicas reportadas en cero.

Para el sitio polimórfico rs3753526 el mejor modelo fue el aditivo (OR=1.98, IC 95%=1.40-2.79; $p < 0.001$; AIC=542.64) y para el polimorfismo rs1044925 se seleccionó el modelo dominante (OR=2.31, IC 95%=1.53-3.49; $p < 0.001$; AIC=542.11) (tabla 12).

Tabla 12. Modelos de herencia para los polimorfismos

SNP	Modelo	OR (IC 95%)	p-value	AIC	
rs2247071	Rec	TT vs CT+CC	---		
	Dom	CT+TT vs CC	---		
	Cod	CC	---		
	Cod 1	CT	---		
	Cod 2	TT	---		
	Het	CT vs TT+CC	---		
	Add		---		
rs2862616	Rec	AA vs AG+GG	---		
	Dom	AG+AA vs GG	---		
	Cod	GG	---		
	Cod 1	AG	---		
	Cod 2	AA	---		
	Het	AG vs AA+GG	---		
	Add		---		
rs3753526	Rec	GG vs CC+CG	---		
	Dom	GG+CG vs CC	1.69 (1.13-2.51)	0.010	551.74
	Cod	CC	1.32 (0.87-1.99)	0.187	
	Cod 1	CG	1		525.44
	Cod 2	GG	---		
	Het	CG vs CC+GG	1.09 (0.73-1.63)	0.678	558.18
	Add		1.98 (1.40-2.79)	<0.001	542.64
rs1044925	Rec	CC vs AC+AA	1.43 (0.71-2.88)	0.315	557.34
	Dom	CC+AC vs AA	2.31 (1.53-3.49)	<0.001	542.11
	Cod	AA	1		
	Cod 1	AC	2.45 (1.56-3.84)	1.559	543.72
	Cod 2	CC	1.91 (0.94-3.92)	0.935	
	Het	AC vs AA+CC	2.25 (1.45-3.50)	<0.001	544.92
Add		1.72 (1.26-2.35)	0.001	546.39	

Rec: recesivo; Dom: dominante; Cod: codominante; Het: heterocigoto; Add: aditivo;
 OR: Odds Ratio. AIC: Criterio de información de Akaike.

Tabla 13. Modelos de herencia y variables relacionadas con el desarrollo de demencia.

Modelos	OR (IC 95%)	Modelo 1 OR (IC95%)	Modelo 2 OR (IC95%)	Modelo 3 OR (IC95%)	Modelo 4 OR (IC95%)
rs3753526 add	1.98 (1.40-2.79)	3.14 (2.09-4.71)	2.98 (1.95-4.55)	3.03 (1.95-4.69)	2.81 (1.80-4.41)
rs1044925 dom	2.31 (1.53-3.49)	4.03 (2.49-6.52)	3.60 (2.18-5.97)	3.48 (2.08-5.80)	3.48 (2.07-5.85)

add: aditivo, dom: dominante, OR: Odds ratio, IC 95%: interval de confianza del 95%

Modelo 1: Modelo con ambos polimorfismos (rs3753526 add y rs1044925 dom)

Modelo 2: Ajustado por edad y sexo

Modelo 3: Ajustado por edad, sexo y glucosa

Modelo 4: Ajustado por edad, sexo, glucosa, EVC y consumo de alcohol

Para construir un modelo que explique de mejor forma el desarrollo de demencia, se construyeron 4 modelos, mostrados en la tabla 13. El primer valor de OR se refiere al riesgo otorgado por el polimorfismo considerando sólo el polimorfismo con su modelo de herencia previamente seleccionado, en el modelo 1 se consideraron los polimorfismos rs3753526 y rs1044925. En el modelo 1 (AIC=509.27) el riesgo para rs3753526 add y para rs1044925 dom aumenta, comparado con el riesgo individual de cada polimorfismo. En el modelo 2 (AIC=475.52) se ajustó por sexo y edad, en el modelo 3 (AIC=463.872) se incluyó el nivel de glucosa. En el modelo 4 (AIC=457.4587), en el que se incluyeron otras variables es el que presenta un menor valor de AIC.

Tener 2 copias del alelo G para el polimorfismo rs3753526 y al menos una copia del alelo C del polimorfismo rs1044925 incrementa el riesgo de padecer demencia (OR=2.81, IC 95%=1.80-4.41 y OR=3.48, IC 95%=2.07-5.85), independientemente de la edad, sexo, nivel de glucosa, EVC y consumo de alcohol.

8.4 Desequilibrio de ligamiento y haplotipos

El análisis de DL se realizó incluyendo los 4 polimorfismos (rs2247071, rs2862616, rs3753526 y rs1044925) (figura 2). Las medidas de DL (tabla 14) fueron de 75 entre el rs2862616 y rs1044925, de 88 para rs2862616 y rs3753526, de 90.3 para rs2247071 y rs1044925, y de 100 para las otras tres combinaciones.

Figura 2. Mapa de disequilibrio de ligamiento

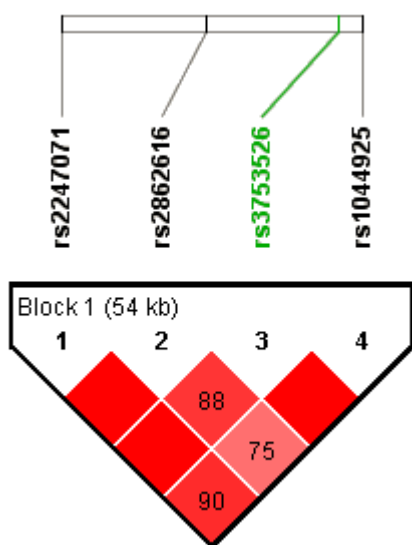


Tabla 14. Medidas de DL entre polimorfismos de ACAT1

SNP 1	SNP 2	D'	LOD
rs2247071	rs2862616	100	29.06
rs2247071	rs3753526	100	2.25
rs2247071	rs1044925	90.3	10.81
rs2862616	rs3753526	88	3.45
rs2862616	rs1044925	75	20.06
rs3753526	rs1044925	100	16.22

Se muestra el valor del coeficiente de DL en cada casilla. La intensidad del color rojo está relacionada con la magnitud del valor de DL.

El análisis para la formación de haplotipos, dio como resultado un bloque compuesto por seis haplotipos (H1:CGCA, H2:CGGA, H3:CGCC, H4:CACC, H5:TACC, H6:CACA) (tabla 15). El haplotipo H1:CGCA mostró una mayor frecuencia en el grupo control, en comparación con el grupo de demencia, lo que sugiere un menor riesgo para desarrollar el padecimiento (OR=0.34, IC 95%=0.23-0.46; $p < 0.001$), mientras el haplotipo H2:CGGA, se encuentra en mayor proporción en el grupo con demencia, sugiriendo una asociación de riesgo con la enfermedad (OR=1.87, IC 95%=1.34-2.60; $p < 0.001$). En este caso, los haplotipos H4:CACC, H5:TACC y H6:CACA no se observaron en el grupo control, solo estuvieron presentes en el grupo con demencia, por lo que no fue posible calcular el valor de OR.

Tabla 15. Frecuencia de haplotipos en pacientes con demencia y control

Haplotipo	Secuencia*	Frecuencia		OR (IC 95%)	p-valor
		Demencia n=196	Controles n=204		
H1	CGCA	0.375	0.635	0.34 (0.23-0.46)	<0.001
H2	CGGA	0.295	0.184	1.87 (1.34-2.60)	<0.001
H3	CGCC	0.134	0.181	0.71 (0.48-1.03)	0.074
H4	CACC	0.083	0.000	---	---
H5	TACC	0.077	0.000	---	---
H6	CACA	0.023	0.000	---	---

*El orden de los polimorfismos en la secuencia de cada haplotipo es de acuerdo con su posición en el cromosoma (rs2247071, rs2862616, rs3753526, rs1044925)

OR= Odds Ratio, IC 95%= Intervalo de confianza del 95%.

9. Discusión

La demencia es un padecimiento multifactorial y con una gran carga genética, una de las hipótesis que ha surgido para explicar el origen y el progreso de la enfermedad relaciona la aparición y el progreso del padecimiento con el metabolismo alterado de los lípidos, en particular del colesterol. Para mantener la homeostasis del colesterol, la enzima ACAT1, tiene una importante función, al prevenir la sobreacumulación de colesterol libre en la célula, formando ésteres de colesterol, a su vez el equilibrio entre estas dos formas del colesterol regulan la producción de A β (62,71). Posibles alteraciones en la actividad o funcionamiento de esta enzima podrían estar relacionadas con una modificación en la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Los polimorfismos genéticos pueden ocasionar un funcionamiento alterado de la enzima, los primeros estudios planteados para investigar la posible relación fueron estudios de asociación con SNPs, sin embargo, existen resultados contradictorios, señalados en la tabla 2.

En este estudio se analizó la relación de 4 polimorfismos presentes en el gen *ACAT1* con la susceptibilidad genética para el desarrollo de EA, DVa y EA/DVa. En nuestra población encontramos una frecuencia de 0.04 para el alelo *T* del sitio rs2247071 y de 0.10 para el alelo *A* del sitio polimórfico rs2862616, frecuencias bajas comparadas con las reportadas para la población americana en el proyecto de los 1000 genomas (www.ncbi.nlm.nih.gov), las cuales son de 0.13 para el alelo *T* y de 0.30 para el alelo *A*. Sin embargo, en el grupo control, estos alelos no están presentes, probablemente debido a la baja frecuencia del polimorfismo observada en nuestra población, el tamaño de muestra no fue suficiente para hallarlos. La frecuencia de los polimorfismos es distinta en las diferentes poblaciones, por lo que resulta importante realizar estudios en población mexicana, de esta forma al reportar la frecuencia puede ser útil para realizar aproximaciones del impacto de los polimorfismos en cada población o para una mejor estimación del tamaño muestral en estudios posteriores.

Aunque se hallaron en mayor proporción en los casos y podría asociarse a la presencia del padecimiento, la frecuencia en cero del grupo control, no permitió realizar el cálculo matemático.

En el estudio realizado por Lamsa y colaboradores (61), en población finlandesa el genotipo *CC* del sitio rs2247071 estuvo en mayor proporción en los casos, incrementando el riesgo de EA (OR=1.4, IC 95%=1.04-1.78; p=0.029) comparado con los otros genotipos. Es este estudio el alelo *T* (genotipo *CT* y *TT*), es el que se encontró mayormente en el grupo de pacientes con demencia. Estos dos sitios polimórficos, rs2247071 y rs2862616, se encuentran en una región intrónica, los polimorfismos presentes en esta región, pueden tener repercusión en la estructura y función del ARN, afectando el proceso de corte y empalme (149).

El sitio polimórfico rs3753526, se encuentra en un exón, en este caso, el cambio de base no ocasiona un cambio de aminoácido, por lo que se denomina una mutación sinónima, sin embargo, los polimorfismos presentes en estas regiones también pueden afectar el proceso de corte y empalme y la eficacia de este proceso. El alelo *G*, después de realizar el ajuste por edad, sexo, EVC, nivel de glucosa y consumo de alcohol muestra un riesgo significativo para padecer demencia (OR=2.81, IC 95%= 1.80-4.41), en un estudio realizado en población finlandesa (61), no se encontró asociación y la frecuencia del alelo *G* fue menor que en nuestra población (casos=0.12 y controles=0.11 vs casos=0.30 y controles=0.11), en ese estudio tampoco reportaron relación significativa con los niveles de A β 42, tau y ptau.

Para rs3753526 el modelo de herencia que mejor se ajusta es el aditivo, lo que indica que tener 2 veces el alelo *G*, duplica el riesgo comparado con el heterocigoto (OR=1.98, IC 95%=1.40-2.79).

El polimorfismo rs1044925, se encuentra en la región 3'UTR, los polimorfismos de esta región podrían afectar la traducción y la estabilidad de los ARNm (150). El alelo *C* está sobre representado en el grupo de demencia, y después de ajustarse por las variables de riesgo mantiene una asociación significativa (OR=3.48, IC95%=2.07-5.85), indicando que el riesgo es el mismo con la presencia de un alelo o de dos (modelo dominante). En un estudio realizado en población China y de Finlandia (61,132), reportaron que no encontraron asociación entre el polimorfismo y el

padecimiento. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Wollmer y colaboradores (131) realizado en 309 pacientes con EA, donde reportan que el alelo A y el genotipo homocigoto para este alelo, se asoció a un menor riesgo para EA (OR=0.6, IC 95%=0.4-0.8). En el estudio, Wollmer, además, reportó que el genotipo AA se asoció a una baja carga amiloide ($p=0.030$) y a un menor nivel de colesterol en líquido cefalorraquídeo (0.46 ± 0.17 vs 0.76 ± 0.26 mg/dL; $p=0.005$). Debido a la naturaleza del procedimiento para obtener las muestras de líquido cefalorraquídeo, en este estudio no se obtuvieron muestras, empleamos las concentraciones a nivel plasmático, y no se encontraron diferencias significativas en el nivel de colesterol total entre los pacientes con demencia y los controles, sin embargo, debido a que los niveles de colesterol en plasma se ven afectados por múltiples factores, como la dieta, el estilo de vida o los medicamentos que consuman, se requerirían otros estudios para verificar el impacto de los polimorfismos en la actividad enzimática. Wollmer y colaboradores sugieren que el genotipo AA puede estar asociado con una reducida actividad de ACAT1, y por lo tanto esto generaría una menor producción de ésteres de colesterol, ocasionando una disminución en la producción de A β .

Por la función que cumple esta enzima, los polimorfismos en el gen que la codifican también han sido estudiados para otras patologías, como la enfermedad arterial coronaria (EAC) y de accidente cerebrovascular isquémico (ACV). Wu y colaboradores (70), en un estudio realizado en población china, encontraron que los genotipos AC/CC y el alelo C del polimorfismo rs1044925 fueron asociados con un menor riesgo de EAC y de ACV. Sin embargo, en otro estudio realizado por Wang (151) también en población China pero en otro grupo étnico, no se encontró asociación entre este polimorfismo y EAC. Las razones para las discrepancias son diversas, pueden ser debidas a las diferencias étnicas, factores ambientales o a las diferencias en el tamaño de muestra. Como se mencionó se había sugerido que el genotipo AA se podría asociar a una menor actividad de ACAT1, lo que generaría una menor producción de ésteres de colesterol y la disminución en la producción de A β , sin embargo, justo esta reducción en la actividad también podría producir un

aumento de colesterol libre, lo que podría explicar que el alelo C se asocie a un menor riesgo de enfermedades cardíacas.

En el análisis por haplotipos, identificamos un haplotipo de protección (H1:CGCA, OR=0.34, IC 95%= 0.23-0.46) y otro de riesgo (H2:CGGA, OR=1.87, IC 95%=1.34-2.60). El alelo G del sitio rs3753526 parece ser el responsable de la modificación del riesgo entre H1 y H2, por otro lado, se identificó un riesgo asociado del alelo G, con un modelo de herencia aditivo con un OR=1.98 (IC 95%= 1.40-2.79) y en los genotipos se encontró el homocigoto GG solamente en los casos.

En un estudio previo (61) se reportó que rs2247071 y rs2862616 estaban fuertemente asociados con un D' de 0.99 y rs3753526 y rs1044925 fueron ligados con un valor D' de 0.95, en nuestro estudio también se encontró una fuerte asociación, con valor de D' en ambos casos.

Hemos tratado de valorar la aplicación de ACAT1 como un posible blanco terapéutico, si tenemos presente que el objetivo de la farmacogenómica es la identificación de biomarcadores genéticos validados para la farmacoterapia individualizada. Podemos suponer que los genes que se han sometido a una selección positiva podrían servir como objetivos farmacológicos primarios, dando como resultado fuertes efectos farmacogenéticos, en el contexto de las variaciones genéticas en los blancos terapéuticos, ha sido complicado llegar a resultados concluyentes (152), esto debido a que la respuesta terapéutica involucra múltiples eventos intermediarios y rutas paralelas.

Los resultados de este estudio permitieron identificar variantes de riesgo, lo que representa el primer paso para lograr establecer marcadores genéticos, las asociaciones genéticas observadas clínicamente pueden identificar genes de riesgo y variantes candidatas, pero las relaciones causales frecuentemente permanecen desconocidas, aclarar los detalles moleculares, es un paso fundamental para la optimización de la utilidad clínica. Además, otro factor importante para que los polimorfismos se conviertan en biomarcadores útiles para la terapia farmacológica, es la frecuencia alélica presente en la población objetivo (152).

En nuestro estudio se incluyeron 3 polimorfismos situados en regiones no codificantes, con el avance de la tecnología, los estudios en estos sitios han cobrado

importancia, una encuesta de asociación de SNPs con rasgos/enfermedad derivado de GWAS reveló que los SNPs en regiones intergénicas contribuyen con el 43%, lo que nos permite dilucidar su importancia (152). Se ha estimado que este tipo de polimorfismos, probablemente serán esenciales para llenar los vacíos en la "heredabilidad faltante", con la promesa de descubrir biomarcadores farmacogenómicos de mayor poder predictivo y, por lo tanto, de mayor valor para la atención médica personalizada.

Sin embargo, es complicado atribuir un efecto muy pronunciado a un solo gen en padecimientos complejos como lo es la demencia. Encontrar la frecuencia de estos polimorfismos en nuestra población es un paso importante, determinar el efecto combinado de los polimorfismos en la modificación del riesgo es una primera aproximación, sin embargo, como se mencionó, un paso fundamental es verificar que las modificaciones genéticas tengan un impacto importante en la actividad, para probar esto se requerirían estudios funcionales.

No se debe perder de vista, que además del factor genético, el medio ambiente y otros factores tienen un papel fundamental en la aparición de estas enfermedades y por ello, en aquellos individuos con susceptibilidad genética a padecerlas, el estilo de vida es determinante para la aparición de las manifestaciones clínicas, por lo que estos factores deben analizarse en conjunto.

10. Conclusiones

La participación del metabolismo alterado de los lípidos, en particular del colesterol, es un tema que se ha estudiado ampliamente sin llegar a un resultado concluyente. La asociación de los niveles de colesterol con DVa aún es controversial, sin embargo, se ha reportado como factor de riesgo para los padecimientos cardiovasculares relacionados con DVa. En cuanto a la relación con Alzheimer se tiene un posible mecanismo por el cual el aumento de los ésteres de colesterol contribuye a la formación de placa $A\beta$, observándose que la disminución de los ésteres mediante el bloqueo de *ACAT1* tiene efectos benéficos sobre el padecimiento, por lo tanto, se ha promovido a *ACAT1* como blanco terapéutico. Aunque será importante realizar estudios con un tamaño de muestra mayor, se obtuvo que los polimorfismos en *ACAT1* modifican la susceptibilidad para desarrollar demencia, esto apoya la hipótesis de que el metabolismo alterado del colesterol está implicado en el desarrollo de la patología y alimenta la idea de que puede ser un posible blanco terapéutico para tratar demencia.

11. Perspectivas futuras

Si bien existe evidencia que relaciona la presencia de los polimorfismos en *ACAT1* con la presencia de demencia y se puede interpretar como una actividad alterada de la actividad enzimática, esto solo podría corroborarse con estudios en los que se evalué la actividad enzimática.

Sería recomendable aumentar el tamaño de muestra, considerando las frecuencias encontradas para nuestra población.

En la búsqueda de perfiles genéticos de riesgo, se podría realizar un análisis con otros genes implicados en el metabolismo del colesterol.

Como se mencionó los estudios en modelos *in vitro* y en modelos animales con la inhibición de *ACAT1* han mostrado efectos prometedores, aún está pendiente probar los inhibidores en estudios clínicos.

12. Referencias

1. OMS y Alzheimer's Disease International (ADI). Dementia: a public health priority. *Demencia*. 2013; 112
2. Paolo G, Kim T. Linking Lipids to Alzheimer's Disease: Cholesterol and Beyond. *Aging*. 2012;12(5):284–96.
3. Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol*. 2006;23(1):111–22.
4. Saxena U. Lipid metabolism and Alzheimer's disease: pathways and possibilities. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(3):331–8.
5. Small SA, Duff K. Linking A β and Tau in Late-Onset Alzheimer's Disease: A Dual Pathway Hypothesis. *Neuron*. 2008;60(4):534–42.
6. Appleton JP, Scutt P, Sprigg N, Bath PM. Hypercholesterolaemia and vascular dementia. *Clin Sci*. 2017;131(14):1561–78.
7. Kalaria RN. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2016;131(5):659–85.
8. Román GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, et al. Vascular dementia: Diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology*. 1993;43(2):250–60.
9. Panza F, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Pichichero G, Capurso SA, et al. Lipid metabolism in cognitive decline and dementia. *Brain Res Rev*. 2006;51(2):275–92.
10. Cubinkova V, Valachova B, Uhrinova I, Brezovakova V, Smolek T, Jadhav S, et al. Alternative hypotheses related to Alzheimer's disease. *Bratislava Med J*. 2018;119(04):210–6.
11. Lütjohann D, Meichsner S, Pettersson H. Lipids in Alzheimer's disease and their potential for therapy. *Clin Lipidol*. 2012;7(1):65–78.
12. Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Sci Transl Med*. 2011;3(77):1–35.
13. Arenas F, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci*. 2017;10.
14. St Clair D, Rennie M, Slorach E, Norrman J, Yates C, Carothers A. Apolipoprotein E ϵ 4 allele is a risk factor for familial and sporadic presenile Alzheimer's disease in both homozygote and heterozygote carriers. *J Med Genet*. 1995;32(8):642–4.
15. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science*. 1993;261:921–3.
16. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 1993;43(8):1467–72.
17. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90(5):1977–81.
18. Rohn TT. Is apolipoprotein E4 an important risk factor for vascular dementia? *2014;7(7):3504–11*.
19. Sun JH, Tan L, Wang HF, Tan MS, Tan L, Li JQ, et al. Genetics of vascular dementia: Systematic review and meta-analysis. *J Alzheimer's Dis*. 2015;46(3):611–29.
20. Yin YW, Li JC, Wang JZ, Li BH, Pi Y, Yang QW, et al. Association between apolipoprotein E gene polymorphism and the risk of vascular dementia: A meta-analysis. *Neurosci Lett*. 2012;514(1):6–11.
21. Skrobot OA, McKnight AJ, Passmore PA, Seripa D, Mecocci P, Panza F, et al. A Validation Study of Vascular Cognitive Impairment Genetics Meta-Analysis Findings in an Independent Collaborative Cohort. *J Alzheimer's Dis*. 2016;53(3):981–9.
22. Ikram MA, Bersano A, Manso R, Jia J, Schmidt H, Middleton L, et al. Genetics of vascular dementia – review from the ICVD working group. *BMC Med*. 2017;15(48):1–7.
23. Shibuya Y, Chang CC, Chang T-Y. ACAT1/SOAT1 as a therapeutic target for Alzheimer's

- disease. *Future Med Chem.* 2015;7(18):2451–67.
24. Lütjohann D, von Bergmann K. 24S-Hydroxycholesterol: a Marker of Brain Cholesterol Metabolism. *Pharmacopsychiatry.* 2003;36:102–6.
 25. Gouw AA, Van Der Flier WM, Fazekas F, Van Straaten ECW, Pantoni L, Poggesi A, et al. Progression of white matter hyperintensities and incidence of new lacunes over a 3-year period: The leukoaraiosis and disability study. *Stroke.* 2008;39(5):1414–20.
 26. Van Dijk EJ, Prins ND, Vrooman HA, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB. Progression of cerebral small vessel disease in relation to risk factors and cognitive consequences: Rotterdam scan study. *Stroke.* 2008;39(10):2712–9.
 27. Longstreth WT, Arnold AM, Beauchamp NJ, Manolio TA, Lefkowitz D, Jungreis C, et al. Incidence, Manifestations, and Predictors of Worsening White Matter on Serial Cranial Magnetic Resonance: The Cardiovascular Health Study. *Stroke.* 2005;36:56–61.
 28. Provenzano FA, Muraskin J, Tosto G, Narkhede A, Wasserman BT, Griffith EY, et al. White matter hyperintensities and cerebral amyloidosis: Necessary and sufficient for clinical expression of Alzheimer disease? *JAMA Neurol.* 2013;70(4):455–61.
 29. Solomon A, Kåreholt I, Ngandu T, Wolozin B, MacDonald SWS, Winblad B, et al. Serum total cholesterol, statins and cognition in non-demented elderly. *Neurobiol Aging.* 2009;30(6):1006–9.
 30. Solomon A, Kivipelto M, Wolozin B, Zhou J, Whitmer RA. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009;28(1):75–80.
 31. Mm M, Pp Z, Sjögren M, Gustafson D, Ostling S, Steen B, et al. High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology.* 2005;64:1689–95.
 32. Alzheimer A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurol Zentralblatt.* 1906;23:1129–36.
 33. Sparks DL, Hunsaker JC, Scheff SW, Kryscio RJ, Henson JL, Markesbery WR. Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1990;11(6):601–7.
 34. Wood GW, Ling L, Muller W, Eckert G. Cholesterol as a causative agent in Alzheimer disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem.* 2014;129(4):559–72.
 35. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *PNAS.* 2001;98(10):5856–61.
 36. Refolo LM, Pappolla MA, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 2000;7(4):321–31.
 37. Posse E. Reciprocal regulation of cholesterol and beta amyloid at the subcellular level in Alzheimer's disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90(6):753–64.
 38. Maulik M, Westaway D, Jhamandas JH, Kar S. Role of cholesterol in APP metabolism and its significance in Alzheimer's disease pathogenesis. *Mol Neurobiol.* 2013;47(1):37–63.
 39. Eckert GP, Wood WG, Müller WE. Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes. *J Neural Transm.* 2001;108(8–9):1051–64.
 40. Kivipelto M, Helkala EL, Hänninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Alhainen K, et al. Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology.* 2001;56(12):1683–9.
 41. Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, et al. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology.* 2003;61(2):199–205.
 42. Whitmer RA, Sidney S, Selby J, Claiborne Johnston S, Yaffe K. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology.* 2005;64(2):277–81.
 43. Suh Y-H. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and alpha -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacol Rev.* 2002;54(3):469–525.
 44. Araki W, Tamaoka A. Amyloid beta-protein and lipid rafts: focused on biogenesis and catabolism. *Front Biosci.* 2015;20(2):314–24.
 45. Khan A, Corbett A, Ballard C. Emerging amyloid and tau targeting treatments for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2017;17(7):697–711.

46. Cossec JC, Simon A, Marquer C, Moldrich RX, Leterrier C, Rossier J, et al. Clathrin-dependent APP endocytosis and A β secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2010;1801(8):846–52.
47. Dart C. Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. *J physiol*. 2010;17:3169–78.
48. Wong MW, Braidy N, Poljak A, Pickford R, Thambisetty M, Sachdev PS. Dysregulation of lipids in Alzheimer's disease and their role as potential biomarkers. *Alzheimer's Dement*. 2017;13(7):810–27.
49. Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer B-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*. 2003;160(1):113–23.
50. Vetrivel KS, Thinakaran G. Amyloidogenic processing of β -amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology [Internet]*. 2006;66:69–73.
51. Djelti F, Braudeau J, Hudry E, Dhenain M, Varin J, Bièche I, et al. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain*. 2015;138(8):2383–98.
52. Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(2):105–12.
53. Canevari L, Clark JB. Alzheimer's disease and cholesterol: The fat connection. *Neurochem Res*. 2007;32(4–5):739–50.
54. Björkhem I, Meaney S, Fogelman AM. Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(5):806–15.
55. Petrov AM, Kasimov MR, Zefirov AL. Brain cholesterol metabolism and its defects: Linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction. *Acta Naturae*. 2016;8(1):58–73.
56. Martin MG, Pfrieger F, Dotti CG. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO*. 2014;15(10):1036–52.
57. Moutinho M, Nunes MJ, Rodrigues E. Cholesterol 24-hydroxylase: Brain cholesterol metabolism and beyond. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2016;1861(12):1911–20.
58. Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, et al. On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett*. 2001;314(1–2):45–8.
59. Lund EG, Xie C, Kotti T, Turley SD, Dietschy JM, Russell DW. Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem*. 2003;278(25):22980–8.
60. Chang CCY, Chen J, Thomas M, Cheng D, Del priore V, Newton RS, et al. Regulation and Immunolocalization of Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase in Mammalian Cells as Studied with Specific Antibodies. *J Biol Chem*. 1995;270(49):29532–40.
61. Lämsä R, Helisalmi S, Herukka SK, Tapiola T, Pirttilä T, Vepsäläinen S, et al. Study on the association between SOAT1 polymorphisms, Alzheimer's disease risk and the level of CSF biomarkers. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;24(2):146–50.
62. Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, Small SA, et al. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2012;287(4):2678–88.
63. Dietschy JM. Central nervous system: Cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem*. 2009;390(4):287–93.
64. Li J, Gu D, Lee SSY, Song B, Bandyopadhyay S, Chen S, et al. Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer. *Oncogene*. 2016;35(50):6378–88.
65. Bemlih S, Poirier MD, El Andaloussi A. Acyl-coenzyme A: Cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe affect survival and proliferation of glioma tumor cell lines. *Cancer Biol Ther*. 2010;9(12):1025–32.
66. Lee SSY, Li J, Tai JN, Ratliff TL, Park K, Cheng JX. Avasimibe encapsulated in human serum albumin blocks cholesterol esterification for selective cancer treatment. *ACS Nano*. 2015;9(3):2420–32.
67. Antalis CJ, Arnold T, Rasool T, Lee B, Buhman KK, Siddiqui RA. High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(3):661–70.
68. Chang CCY, Huh HY, Cadigan KM, Chang TY. Molecular cloning and functional expression

of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1993;268(28):20747–55.

69. Rogers MA, Liu J, Song B, Li B, Chang CCY, Chang T, et al. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;151:102–7.

70. Wu D-F, Yin R-X, Cao X-L, Chen W-X. Association between Single Nucleotide Polymorphism rs1044925 and the Risk of Coronary Artery Disease and Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):3546–59.

71. Tajima Y, Ishikawa M, Maekawa K, Murayama M, Senoo Y, Nishimaki T, et al. Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis.* 2013;12(68):1–14.

72. Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, Ingano LAMK, Berezovska O, Hyman BT, et al. Acyl-coenzyme A: Cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid β -peptide. *Nat Cell Biol.* 2001;3(10):905–12.

73. Hutter-Paier B, Huttunen HJ, Puglielli L, Eckman CB, Kim DY, Hofmeister A, et al. The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2004;44(2):227–38.

74. Huttunen HJ, Greco C, Kovacs DM. Knockdown of ACAT-1 reduces amyloidogenic processing of APP. *FEBS Lett.* 2007;581(8):1688–92.

75. Huttunen HJ, Peach C, Bhattacharyya R, Barren C, Pettingell W, Hutter-Paier B, et al. Inhibition of acyl-coenzyme A: cholesterol acyl transferase modulates amyloid precursor protein trafficking in the early secretory pathway. *FASEB J.* 2009;23(11):3819–28.

76. Bryleva EY, Rogers MA, Chang CCY, Buen F, Harris BT, Rousselet E, et al. ACAT1 gene ablation increases 24(S)-hydroxycholesterol content in the brain and ameliorates amyloid pathology in mice with AD. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(7):3081–6.

77. Huttunen HJ, Havas D, Peach C, Barren C, Duller S, Xia W, et al. The Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase Inhibitor CI-1011 Reverses Diffuse Brain Amyloid Pathology in Aged Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(8):777–88.

78. Murphy SR, Chang CCY, Dogbevia G, Bryleva EY, Bowen Z, Hasan MT, et al. Acat1 knockdown gene therapy decreases amyloid- β in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Ther.* 2013;21(8):1497–506.

79. Shibuya Y, Chang CCY, Huang L-H, Bryleva EY, Chang T-Y. Inhibiting ACAT1/SOAT1 in Microglia Stimulates Autophagy-Mediated Lysosomal Proteolysis and Increases A β 1-42 Clearance. *J Neurosci.* 2014;34(43):14484–501.

80. Shibuya Y, Niu Z, Bryleva EY, Harris BT, Stephanie R, Kheirollah A, et al. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 blockage enhances autophagy in the neurons of triple transgenic Alzheimer's disease mouse and reduces human P301L-tau content at the pre-symptomatic stage. *Neurobiol Aging.* 2015;36(7):2248–59.

81. Bhattacharyya R, Kovacs DM. ACAT inhibition and amyloid beta reduction. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2010;1801(8):960–5.

82. Roth BD. ACAT inhibitors: evolution from cholesterol-absorption inhibitors to antiatherosclerotic agents. *Drug Discov Today.* 1998;3(1):19–25.

83. Hainer JW, Terry JG, Connell JM, Zyruk H, Jenkins RM, Shand DL, et al. Effect of the acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor DuP 128 on cholesterol absorption and serum cholesterol in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1994;56(1):65–74.

84. Llaverias G, Alegret M. Inhibidores de la acil coenzima A:colesterol aciltransferasa (ACAT): mecanismos y perspectivas terapéuticas. *Clin Invest Arter.* 2004;16(6):250–61.

85. Bocan TM1, Mueller SB, Uhlendorf PD, Newton RS KB. Comparison of CI-976, an ACAT inhibitor, and selected lipid-lowering agents for antiatherosclerotic activity in iliac-femoral and thoracic aortic lesions. A biochemical, morphological, and morphometric evaluation. *Arter Thromb.* 1991;11(6):1830–43.

86. Lee HT, Sliskovic DR, Picard JA, Roth BD, Wierenga W, Hicks JL, et al. Inhibitors of Acyl-CoA:cholesterol O-Acyl transferase (ACAT) as hypocholesterolemic agents. CI-1011: An acyl sulfamate with unique cholesterol-lowering activity in animals fed noncholesterol-supplemented diets. *J Med Chem.* 1996;39(26):5031–4.

87. Tardif JC, Grégoire J, L'Allier PL, Anderson TJ, Bertrand O, Reeves F, et al. Effects of the

acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe on human atherosclerotic lesions. *Circulation*. 2004;110(21):3372–7.

88. Nicholls SJ, Sipahi I, Schoenhagen P, Wisniewski L, Churchill T, Crowe T, et al. Intravascular ultrasound assessment of novel antiatherosclerotic therapies: Rationale and design of the Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase Intravascular Atherosclerosis Treatment Evaluation (ACTIVATE) Study. *Am Heart J*. 2006;152(1):67–74.

89. Meuwese M, Groot E, Duivenvoorden R, Trip M, Ose L, Maritz F, et al. ACAT Inhibition and Progression of Carotid Atherosclerosis in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Jama*. 2009;301(11):1131–9.

90. Nissen SE, Tardif J-C, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, et al. Effect of ACAT Inhibition on the Progression of Coronary Atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(12):1253–63.

91. Schmidt JA, Brown WJ. Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 regulates Golgi complex structure and function. *J Cell Biol*. 2009;186(2):211–8.

92. Hickman SE, Allison EK, Khoury J. Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*. 2008;28(33):8354–60.

93. Grieciuc A, Serrano A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin N, Mullin K, et al. Alzheimer's Disease Risk Gene CD33 Inhibits Microglial Uptake of Amyloid Beta. *Neuron*. 2013;78(4):631–43.

94. Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid- β , and Tau: Effects on cognitive impairments. *J Biol Chem*. 2010;285(17):13107–20.

95. Area-Gomez E, Del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD, Guardia-Laguarta C, De Groof AJC, Madra M, et al. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J*. 2012;31(21):4106–23.

96. Y.Y. Szeto J, J.G. Lewis S. Current Treatment Options for Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease Dementia. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(4):326–38.

97. Kim LD, Factora RM. Alzheimer dementia: Starting, stopping drug therapy. *Cleve Clin J Med*. 2018;85(3):209–14.

98. H. Ferreira-Vieira T, M. Guimaraes I, R. Silva F, M. Ribeiro F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(1):101–15.

99. Kaushik V, Smith ST, Mikobi E, Raji MA. Acetylcholinesterase Inhibitors: Beneficial Effects on Comorbidities in Patients With Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2018;33(2):73–85.

100. Mohammad D, Chan P, Bradley J, Lanctôt K, Herrmann N. Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms - a safety evaluation. *Expert Opin Drug Saf*. 2017;16(9):1009–19.

101. Tan L. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(2):615–31.

102. Emre M, Mecocci P, Stender K. Pooled analyses on cognitive effects of memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2008;14(2):193–9.

103. Areosa SA, Sherriff F. Memantine for dementia. *Cochrane Libr*. 2003;(3).

104. Lopez OL, Becker JT, Wahed AS, Saxton J, Sweet RA. Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(6):600–7.

105. Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ. Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2003;348(14):1333–41.

106. Folch J, Ettcheto M, Petrov D, Abad S, Pedrós I, Marin M, et al. Una revisión de los avances en la terapéutica de la enfermedad de Alzheimer: estrategia frente a la proteína β -amiloide. *Neurología*. 2015;33(1):47–58.

107. Godyń J, Jończyk J, Panek D, Malawska B. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacol Reports*. 2016;68(1):127–38.

108. Loera-Valencia R, Piras A, Ismail MAM, Manchanda S, Eyjolfsdottir H, Saido TC, et al. Targeting Alzheimer's Disease with Gene and Cell Therapies. *J Intern Med*. 2018

109. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018;25(1):59–70.

110. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. 2000;356:1627–31.

111. Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, et al. Use of lipid-

lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol.* 2002;59(2):223–7.

112. Wolozin B. Decreased Prevalence of Alzheimer Disease Associated With 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors. *Arch Neurol.* 2000;57(10):1439.

113. Daneschvar HL, Aronson MD, Smetana GW. Do statins prevent Alzheimer's disease? A narrative review. *Eur J Intern Med.* 2015;26(9):666–9.

114. Swiger KJ, Manalac RJ, Blumenthal RS, Blaha MJ, Martin SS. Statins and cognition: A systematic review and meta-analysis of short- and long-term cognitive effects. *Mayo Clin Proc.* 2013;88(11):1213–21.

115. Cramer C, Haan MN, Galea S, Langa KM, Kalbfleisch JD. Use of statins and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in a cohort study. *Neurology.* 2008;71(5):344–50.

116. Sparks L, Kryscio RJ, Sabbagh MN, Connor DJ, Sparks LM, Liebsack C. Reduced risk of incident AD with elective statin use in a clinical trial cohort. *Curr Alzheimer Res.* 2008;5(4):416–21.

117. Haag MDM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stricker BHC, Breteler MMB. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(1):13–7.

118. Arvanitakis Z, Schneider J, Wilson R, Bienias J, Kelly J, Evans D, et al. Statins, incident Alzheimer disease, change in cognitive function, and neuropathology. *Neurology.* 2008;70(24):1795–802

119. McGuinness B, Craig D, Bullock R, Passmore P. Statins for the prevention of dementia. *Cochrane Libr.* 2016;(1).

120. Cacabelos R, Cacabelos P, Torrellas C, Tellado I, Carril JC. Pharmacogenomics of Alzheimer's Disease: Novel Therapeutic Strategies for Drug Development. Springer S.2014;1175:323-556

121. Cacabelos R. Pharmacogenomics and therapeutic prospects in Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2005;6:1967–87.

122. Rodríguez Arcas MJ, García-Jiménez E, Martínez-Martínez F, Conesa-Zamora P. Papel del citocromo P450 en la farmacocinética y en la farmacogenética de los fármacos antihipertensivos. *Farm Hosp.* 2011;35(2):84–92.

123. Bai F, Yuan Y, Shi Y, Zhang Z. Multiple genetic imaging study of the association between cholesterol metabolism and brain functional alterations in individuals with risk factors for Alzheimer's disease. *Oncotarget.* 2016;7(13):15315–28.

124. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. NOTA METODOLÓGICA Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 2005;19(4):333–41.

125. Caratachea MAC. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir.* 2007;20(3):213–21.

126. Karch CM, Cruchaga C, Goate AM. Alzheimer's Disease Genetics: From the Bench to the Clinic. *Neuron.* 2014;83(1):11–26.

127. Cacabelos R, Torrellas C, Tejjido O, Carril JC. Pharmacogenetic considerations in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics.* 2016;17:1041–74.

128. Ridge PG, Mukherjee S, Crane PK, Kauwe JSK. Alzheimer's disease: Analyzing the missing heritability. *PLoS One.* 2013;8(11):1–10.

129. Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: The cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 2003;6(4):345–51.

130. Huang Y, Mucke L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies Yadong. *Cell.* 2012;148(6):1204–22.

131. Wollmer MA, Streffer JR, Tsolaki M, Grimaldi LME, Lütjohann D, Thal D, et al. Genetic association of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase with cerebrospinal fluid cholesterol levels, brain amyloid load, and risk for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 2003;8(6):635–8.

132. Zhao FG, Wang YH, Yang JF, Ma QL, Tang Z, Dong XM, et al. Association between acyl-coenzyme A: Cholesterol acyltransferase gene and risk for Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci Lett.* 2005;388(1):17–20.

133. Bertram L, Hsiao M, Mullin K, Parkinson M, Menon R, Moscarillo TJ, et al. ACAT1 is not associated with Alzheimer's disease in two independent family-based samples. *Mol Psychiatry.* 2005;10(6):522–4.

134. Liu X, Yue C, Xu Z, Shu H, Pu M, Yu H, et al. Association study of candidate gene polymorphisms with amnesic mild cognitive impairment in a Chinese population. *PLoS One*. 2012;7(7):1–7.
135. Picard C, Julien C, Frappier J, Miron J, Théroneux L, Dea D, et al. Alterations in cholesterol metabolism-related genes in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2018;66:180.e1–180.e9.
136. Jones L, Holmans PA, Hamshere ML, Harold D, Moskvina V, Ivanov D, et al. Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2010;5(11).
137. Li H, Wetten S, Li L, St Jean P, Upmanyu R, Surch L, et al. Candidate Single-Nucleotide Polymorphisms From a Genomewide Association Study of Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 2008;65(1):45–53.
138. Kawamata J, Tanaka S, Shimohama S, Ueda K, Kimura J. Apolipoprotein E polymorphism in Japanese patients with Alzheimer's disease or vascular dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(11):1414–6.
139. Dwyer R, Skrobot OA, Dwyer J, Munafo M, Kehoe PG. Using Alzgene-like approaches to investigate susceptibility genes for vascular cognitive impairment. *J Alzheimer's Dis*. 2013;34(1):145–54.
140. Sulkava R, Kainulainen K, Verkkoniemi A, Niinistö L, Sobel E, Davanipour Z, et al. APOE alleles in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia in a Population aged 85+. *Neurobiol Aging*. 1996;17(3):373–6.
141. Cruz F, Durany N, Thome J, Riederer P, Zambón D. Correlation between apolipoprotein-E polymorphism and Alzheimer's disease pathology. *J Alzheimer's Dis*. 2000;2:223–9.
142. Juárez-Cedillo T, Sanchez-Arenas R, Sanchez-García S, García-Peña C, Hsiung GYR, Sepehry AA, et al. Prevalence of mild cognitive impairment and its subtypes in the Mexican population. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2013;34(5–6):271–81.
143. Gómez M, Danglot C, Huerta S, García G. El estudio de casos y controles: su diseño, análisis e interpretación, en investigación clínica. *Rev Mex Pediatr*. 2003;70(5):257–63.
144. Mckhann G, Drachman D, Folstein M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group. *Neurology*. 1984;34:939–44.
145. Vargas-Alarcón G, Juárez-Cedillo E, Martínez-Rodríguez N, Fragoso JM, García-Hernández N, Juárez-Cedillo T. Association of interleukin-10 polymorphisms with risk factors of Alzheimer's disease and other dementias (SADEM study). *Immunol Lett*. 2016;177:47–52.
146. Juárez-Cedillo T, Basurto-Acevedo L, Vega-García S, Manuel-Apolinar L, Cruz-Tesoro E, Rodríguez-Pérez JM, et al. Prevalence of anemia and its impact on the state of frailty in elderly people living in the community: SADEM study. *Ann Hematol*. 2014;93(12):2057–62.
147. DeLong D, DeLong E, Wood P, Lippel K, Rifkind B. A Comparison of Methods for the Estimation of Plasma Low- and Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Jama*. 1986;256(17):2372–7.
148. Lahiri DK, Numberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
149. Ramírez J, Jiménez M. Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. *Gac Med Mex*. 2017;153:218–29.
150. Ramírez J, Vargas G, Tovilla C, Fragoso J. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Med Mex*. 2013;149:220–8.
151. Wang Y-T, Wang Y-H, Ma Y-T, Fu Z-Y, Yang Y-N, Ma X, et al. ACAT-1 gene polymorphism is associated with increased susceptibility to coronary artery disease in Chinese Han population: a case-control study. *Oncotarget*. 2017;8(51):89055–63.
152. Sadee W, Wang D, Papp A, Pinsonneault J, Smith R, Moyer R, et al. Pharmacogenomics of the RNA World: Structural RNA Polymorphisms in Drug Therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(3):355–65.

13. Anexo

13.1 Extracción de DNA

1. Destruir el coágulo
2. Centrifugar el tubo Falcon 3-5 minutos a 1500 rpm
3. Transferir sólo el sobrenadante a otro tubo (sin restos de coagulo)
4. Aforar a 35 mL con TKM1 (pH 7.6)
5. Agregar 150 µL de tritón
6. Agitar de 10-15 segundos en agitador o vigorosamente manualmente 1 minuto
7. Centrifugar 10 minutos a 3500 rpm
8. Encender el termociclador (55°C)
9. Desechar el sobrenadante (conservar el botón)
10. Agregar 15-20 mL de TKM1 deshaciendo el botón, centrifugar 10 minutos a 3200 rpm
11. Repetir hasta que el sobrenadante sea transparente
12. Retirar sobrenadante conservando el botón, secar lo más que se pueda y agregar 800 µL de TKM II
13. Transferir el botón con TKM II a un tubo eppendorf de 1.5 mL
14. Agregar 35 µL de SDS al 20 %
15. Colocar en el termociclador 15 minutos a 55 °C a los 10 minutos colocar en el vortex y regresar a término el proceso
16. Agregar 300 µL de NaCl 5 M, colocar en el vortex y posteriormente centrifugar a 3200 rpm durante 10 minutos
17. Separar el sobrenadante en 2 tubos eppendorf de 1.5 mL (550 µL por tubo)
18. Desechar el botón
19. Agregar en cada tubo con sobrenadante 800 µL de etanol absoluto frio (para precipitar el DNA)
20. Agitar por inversión de 20-30 veces, centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos
21. Decantar sobrenadante y conservar el botón de DNA
22. Agregar al botón 700 µL de etanol al 70% frio
23. Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 minutos
24. Desechar el sobrenadante, dejar seco el botón
25. Pasar al speed back 8-10 minutos a 45°C
26. Resuspender el DNA agregando de 50-100 µL de agua destilada
27. Colocar en el termociclador a 60°C durante mínimo 10 minutos
28. Guardar a -80°C.