



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Determinación del alelo  $\epsilon 4$  del gen de la Apolipoproteína E  
como factor de susceptibilidad para desarrollar  
Neuromielitis Óptica en una muestra de población mestiza  
mexicana**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA  
DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**NANCY MONDRAGÓN MARÍN**

**ASESORES:**

**DR. JORGE LUIS GUERRERO CAMACHO  
DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
Exámenes Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

**Determinación del alelo  $\epsilon 4$  del gen de la Apolipoproteína E como factor de susceptibilidad para desarrollar Neuromielitis óptica en una muestra de población mestiza mexicana.**

Que presenta la pasante: **Nancy Mondragón Marín**

Con número de cuenta: **314314110** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de octubre de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
<b>VOCAL</b>	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. Maritere Domínguez Rojas	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/javg

---

*La presente investigación se realizó en el Departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco, bajo la asesoría del Dr. Jorge Luis Guerrero Camacho y la asesoría interna de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo*

---

## ***DEDICATORIAS***

***Con todo mi amor, a mis padres, por estar siempre para mí, motivarme todos los días y por ser un gran ejemplo de vida.***

***A mis hermanos, por acompañarme en mis noches de desvelo, por apoyarme y sacarme una sonrisa cuando sentía que ya no podía.***

***En especial, a mi abuela Graciela por ser un ejemplo de superación y por enseñarme que no hay impedimento para cumplir mis sueños y a mi abuelo Isidro ¡Lo logré!  
Este logro es tuyo.***

## ***AGRADECIMIENTOS.***

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado las mejores experiencias de mi vida, pero sobre todo por permitirme conocer profesores y amigos que marcaron mi vida.

A mis amigas de la facultad, Jessica y Mafer, por hacer mis días más amenos y por siempre mostrarme su apoyo. Las quiero mucho.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, por ser una profesora admirable, por resolver mis dudas, aunque fueran las más mínimas y compartir sus conocimientos conmigo. Le estoy muy agradecida.

Con especial cariño al Dr. Jorge Luis Guerrero Camacho, gracias por confiar en mí, por darme la oportunidad y motivarme a seguir cumpliendo mis sueños. Por compartir sus conocimientos conmigo y por todos los buenos consejos que me brindó a nivel profesional y personal. No sólo conocí a un gran Dr. con grandes proyectos, sino que tuve la dicha de conocer a una persona extraordinaria. Gracias por todo.

A Eukeni, Lety, Adriana, Miguel, al Dr. Jara, Nancy, David, Don Gabino y a la Sra. Alba, por hacerme sentir como en casa durante mi estadía en el INNyN, me llevo todas las risas, los consejos y los buenos momentos que viví con ustedes. Estoy agradecida por haberlos conocido, siempre los recordaré y los llevo en mi corazón.

## RESUMEN

La ApoE es una proteína que pertenece a la familia de las apolipoproteínas que tienen como función regular el metabolismo de los lípidos. A nivel del sistema nervioso central (SNC), es sintetizada por los astrocitos, la microglía, los pericitos y por las células endoteliales; siendo importante en el metabolismo neuronal ya que se une al colesterol para favorecer su incorporación a las membranas celulares y en especial a la mielina. El gen APOE presenta tres isoformas:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ . Esta reportado que  $\epsilon 3$  es el alelo común,  $\epsilon 2$  se caracteriza por la disminución de los niveles totales de colesterol, mientras que  $\epsilon 4$  se considera factor de riesgo para desarrollar enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer (EA) y desmielinizantes, como la Esclerosis Múltiple (EM). Anteriormente, se tenía reportado que la Neuromielitis Óptica (NMO) era una variable de la EM, esto debido a que la sintomatología es similar en dichas enfermedades. En 1984, Eugéne Devic describió a la NMO como una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del SNC caracterizada por brotes de neuritis óptica y mielitis. Actualmente, se puede diferenciar a la NMO de la EM por la presencia de anticuerpos anti-acuaporina (IgG-AQP4), descartando a la NMO como variable de la EM. La AQP4, es un canal de agua que se encuentra en los pies de los astrocitos, por lo que al estar presentes los IgG-NMO dan paso al proceso de desmielinización y así mismo a desarrollar la enfermedad. Por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue determinar mediante la técnica de PCR-RFLP el alelo  $\epsilon 4$  del gen APOE y evaluar si es un factor de susceptibilidad para el desarrollo de Neuromielitis óptica en una población mestiza mexicana. Para ello, se realizó un estudio de casos y controles, en el cual se analizó a un grupo de 264 pacientes con enfermedad desmielinizante (ED) de los cuales 82 fueron diagnosticados con NMO y 229 controles a los que se les tomó una muestra de sangre periférica a partir de la cual se aisló el DNA y se genotipificó el gen APOE por medio de la técnica PCR-RFLP. Los resultados mostraron que en las muestras analizadas se identificaron 5 genotipos (E4/4, E4/3, E4/2, E3/3 y E3/2) de los cuales el más frecuente en pacientes con NMO fue el genotipo E3/3 (85.2%) que, en el resto de los pacientes con ED, diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0.009$ ) influenciada por el sexo femenino [NMO (60 casos, 85.7%) vs. ED (82 casos, 71.3%) OR= 2.41, IC95%= 1.10-5.28,  $p= 0.024$ ]., mientras que el alelo  $\epsilon 2$  es significativamente más frecuente en el grupo control (7.4%) que en el grupo de pacientes ED (2.7%; OR= 0.34, IC95%= 0.15-0.76,  $p= 0.006$ ) actuando como factor protector contra la enfermedad desmielinizante. Por último, el alelo  $\epsilon 4$  de APOE resultó ser más frecuente en el grupo de ED que en el grupo de NMO (13.6%; OR= 0.47,  $p= 0.037$ ). Se concluye que contrario a lo esperado, el genotipo APOE 3/3 está asociado como factor de riesgo para Neuromielitis óptica, principalmente en mujeres, mientras que el alelo  $\epsilon 4$  de APOE es más frecuente en casos de Esclerosis múltiple.

# ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	IV
<b>Glosario de abreviaturas</b> .....	V
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Sistema Nervioso .....	1
1.1 Generalidades.....	1
1.1.1. Sistema Nervioso Periférico .....	2
1.1.2. Sistema Nervioso Central.....	2
1.1.3. Barrera Hematoencefálica.....	4
1.1.3.1. Unidad Neurovascular .....	4
1.1.3.1.1. Astrocitos .....	5
1.1.3.1.2. Pericitos.....	6
1.1.3.1.3. Microglía.....	7
1.1.3.2. Acuaporinas.....	8
1.1.3.2.1. Acuaporina 4 .....	9
1.1.4. Mielinización .....	9
2. Lipoproteínas .....	11
2.1 Clasificación.....	12
2.2. Apolipoproteínas .....	13
2.2.1. Apolipoproteína E (ApoE).....	13
2.2.1.1. Interacción de ApoE con otras proteínas.....	14
2.2.1.2. Relación de ApoE con el Sistema Vascul ar .....	20
2.2.1.3. Relación de ApoE con el Sistema Nervioso Central.....	21
3. Enfermedades desmielinizantes.....	23
3.1 Esclerosis múltiple vs Neuromielitis óptica.....	25
3.2 Neuromielitis óptica .....	26
3.2.1 Incidencia y prevalencia .....	29
3.2.2 Desmielinización.....	31
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	34
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	35
a) OBJETIVO GENERAL .....	35
b) OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35



<b>IV.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>V.</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	36
<b>VI.</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	37
1.	Selección de muestras del banco de DNA del INNyN ( <i>Ver Anexos 1</i> ).....	37
2.	Cuantificación del DNA .....	37
3.	Evaluación de la integridad del DNA .....	37
4.	Genotipificación.....	37
5.	Análisis estadístico.....	41
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	42
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	54
<b>X.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	55
	<b>ANEXOS</b> .....	56
1.	Metodología para la extracción de DNA a partir de sangre periférica .....	56
2.	Criterios de la evaluación de la integridad.....	57
3.	Condiciones adecuadas para la realización de PCR .....	57
	<b>Bibliografía</b> .....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Modelo estructural de la neurona.....	1
Figura 2	Representación de la Unidad Neurovascular .....	7
Figura 3	Estructura de las acuaporinas .....	8
Figura 4	Proceso de mielinización .....	10
Figura 5	Estructura de las lipoproteínas .....	11
Figura 6	Estructura proteica de ApoE .....	14
Figura 7	Modelo de interacción de ApoE con otras proteínas .....	18
Figura 8	Diagrama de relación entre ApoE y su interacción con otras proteínas .....	20
Figura 9	Rutas de síntesis de ApoE en el cerebro y su regulación.....	23
Figura 10	Inmunohistoquímica convencional contra AQP4 .....	27
Figura 11	Prevalencia de NMOSD según los criterios de NMOSD de 2015.....	30
Figura 12 A	Mecanismo de patogénesis en NMO.....	32
Figura 12 B	Mecanismo de patogénesis en NMO.....	33
Figura 13	Separación electroforética de fragmentos HhaI.....	41
Figura 14	Integridad de muestras de DNA genómico .....	42
Figura 15	Amplificación de fragmentos de DNA genómico por medio de la técnica de PCR de punto final .....	43
Figura 16	Genotipificación del gen APOE por medio de la técnica RFLP.....	43
Figura 17	Proceso de desmielinización asociado con APOE.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Neuro-histología del Sistema Nervioso.....	3
Tabla 2	Clasificación de las lipoproteínas .....	12
Tabla 3	Proteínas que interactúan con ApoE.....	15
Tabla 4	Enfermedades relacionadas con ApoE y su interacción con otras proteínas .....	19
Tabla 5	Descripción de las diversas enfermedades desmielinizantes.....	24
Tabla 6	Diferencias entre NMO y EM .....	25
Tabla 7	Características clínicas de la NMO .....	28
Tabla 8	Secuencia de nucleótidos del gen APOE y de los oligonucleótidos F4 y F6 .....	38
Tabla 9	Secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Hha I y sus sitios de corte en la secuencia nucleotídica del gen APOE .....	38
Tabla 10	Componentes de la reacción para PCR .....	39
Tabla 11	Condiciones de reacción para la PCR de punto final .....	39
Tabla 12	Condiciones para RFLP.....	40
Tabla 13	Fragmentos relacionados con los genotipos del gen APOE.....	40
Tabla 14	Genotipos de APOE y frecuencias alélicas en pacientes con enfermedades desmielinizantes y controles.....	44
Tabla 15	Asociación genotípica y alélica de APOE en población mestiza mexicana.....	46
Tabla 16	Comparación entre NMO y EM .....	49

## Glosario de abreviaturas

ApoA	Apolipoproteína A
ApoE	Apolipoproteína E
ApoB	Apolipoproteína B
AQP4	Acuaporina 4
BHE	Barrera Hematoencefálica
BOC	Bandas Oligoclonales
CRION	Neuropatía Óptica Inflamatoria Recurrente Crónica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
EA	Enfermedad de Alzheimer
ED	Enfermedad desmielinizante
EAAT2	Transportador de aminoácidos excitadores 2
EHW	Equilibrio Hardy-Weinberg
EM	Esclerosis Múltiple
EMDA	Encefalomiелitis aguda diseminada
EMPP	Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva
EMRR	Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente
EMSP	Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
FL	Fosfolípidos
IgG-AQP4	Anticuerpos anti-Acuaporina 4
IL-6	Interleucina 6
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
ML	Mielitis longitudinal
MTLE	Mielitis Transversa Longitudinal Extensa
MT	Mielitis transversa
NMO	Neuromielitis Óptica
NMOSD	Espectro de Neuromielitis Óptica
NO	Neuritis Óptica
MGnD	Fenotipo neurodegenerativo microglial

MOPs	Matrices ortogonales de partículas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RCV	Riesgo cardiovascular
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
SCA	Síndrome clínico asilado
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TAG	Triacilglicerol
TREM2	Receptor desencadenante expresado en las células mieloides 2
UNV	Unidad Neurovascular
VC	Vasculatura Cerebral
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Sistema Nervioso

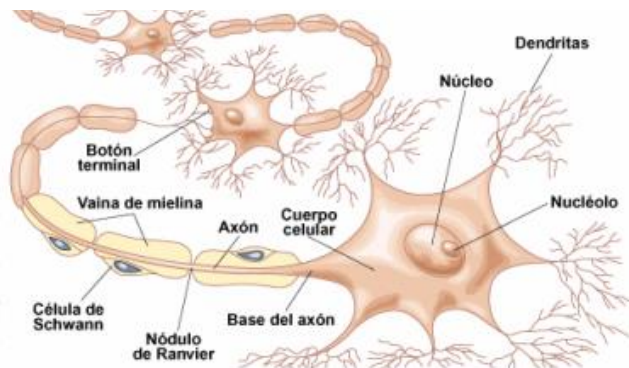
### 1.1 Generalidades

El sistema nervioso es una red compleja de estructuras especializadas (encéfalo, médula espinal y nervios) que tienen como misión controlar y regular el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas, coordinando su interrelación y la relación del organismo con el medio externo. El sistema nervioso está organizado para detectar cambios en el medio interno y externo, evaluar esta información y responder a través de ocasionar cambios en músculos o glándulas. (Tortosa, A. y Reiriz, J., 2015)

Las neuronas son la unidad estructural y funcional del sistema nervioso; están especializadas en la recepción de estímulos químicos y físicos, así como de conducir estímulos electroquímicos, y liberar reguladores químicos. Las neuronas son células altamente especializadas y morfológicamente pueden ser divididas en cuatro regiones: el soma que es el centro metabólico de la célula; las dendritas, estructuras ramificadas que reciben señales de otras células; el axón, que se extiende a partir del soma de la célula nerviosa y que conduce la información a otras neuronas y por último las terminales presinápticas que constituyen la región de la neurona que permite la comunicación con otras neuronas a través de estructuras especializadas llamadas sinapsis (*Figura 1*) (García, O. y Massieu, L., 2004).

### Figura 1

#### *Modelo estructural de la neurona*



La neurona está conformada por un soma que contiene al núcleo, por un axón que es conformado por los oligodendrocitos o células de Schwann, la vaina de mielina y los nódulos de Ranvier y también por prolongaciones llamadas dendritas. *Fuente: Matamala, D., 2015*

### 1.1.1. Sistema Nervioso Periférico

El sistema nervioso periférico (SNP) está formado por nervios que conectan el encéfalo y la médula espinal con otras partes del cuerpo. Los nervios que se originan en el encéfalo se denominan nervios craneales, y los que se originan en la médula espinal, nervios raquídeos o espinales. Los ganglios son pequeños acúmulos de tejido nervioso situados en el SNP, los cuales contienen cuerpos neuronales y están asociados a nervios craneales o a nervios espinales (Tortosa, A. y Reiriz, J., 2015). Los nervios periféricos están formados por haces de fibras nerviosas. Estas fibras están revestidas por numerosas capas de una sustancia grasa denominada mielina, que forma una vaina que acelera la conducción de los impulsos nerviosos a lo largo de la fibra nerviosa (Maiese, K., 2021).

### 1.1.2. Sistema Nervioso Central

El Sistema Nervioso Central (SNC) está formado por el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo es la parte contenida en el cráneo y el cuál comprende el cerebro, el cerebelo y el tronco del encéfalo. La médula espinal es la parte del sistema nervioso central situado en el interior del canal vertebral y se conecta con el encéfalo a través del agujero occipital del cráneo. El SNC recibe, integra y correlaciona distintos tipos de información sensorial (Tortosa, A. y Reiriz, J., 2015).

El SNC, está conformado por una variedad de células, las cuales juegan un papel importante para el funcionamiento de este, en la *Tabla 1* se describe a cada una de ellas, así como los mecanismos y/o proteínas involucradas.

**Tabla 1***Neuro-histología del Sistema Nervioso*

<b>CÉLULA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES</b>	<b>MECANISMOS/PROTEÍNAS INVOLUCRADAS</b>
<b>NEURONA</b>	Integrada por un cuerpo celular, dendritas y un axón Unidad básica funcional y estructural del SNC	Sinapsis Recepción de estímulos y conducción del impulso nervioso Sintetizan y secretan ApoE (estrés)
<b>ASTROCITO</b>	Forma estrellada Presentan en el soma haces de filamentos intermedios compuestos de proteína ácida fibrilar	Forman parte de la BHE manteniendo su integridad Reserva de glucógeno Amortiguador iónico Soporte estructural y metabólico Modificador sináptico Sintetizan y secretan APOE Expresión de AQP4
<b>PERICITO</b>	Núcleo grande con extensiones citoplasmáticas que envuelven al capilar. Se encuentran en contacto con células endoteliales.	Células de soporte y estabilización de capilares Formación de micro vasos Producen lámina basal Regulan la homeostasis de la BHE
<b>OLIGODENDROCITO</b>	Núcleo esférico y más pequeño que astrocitos Nivel de SNC	Formadoras de mielina y mielinizan los axones
<b>MICROGLÍA</b>	Dispersas en el SNC Células pequeñas con núcleo denso	Fagocitosis Sintetizan y secretan APOE
<b>EPENDIMARIAS</b>	Capa de células cilíndricas que reviste las cavidades: ventrículos cerebrales y canal central de la médula espinal Células móviles	Transporte de fluidos Formadoras de epitelio secretor de los plexos coroideos Tanicitos: transportan LCE a neuronas
<b>SATÉLITES</b>		Soporte físico, protección y nutrición para células ganglionares en el SNP
<b>SCHWAN</b>	Situadas en SNP	Forman mielina Mielinizan un internodo del axón Sintetizan y secretan APOE

Descripción de las células del Sistema Nervioso Central y su función de acuerdo con las proteínas y mecanismos en los que están involucradas. *Fuente: Matamala, D., 2015; Gould, J., 2014; Serrano, C., 2022*



### 1.1.3. Barrera Hematoencefálica

La Barrera Hematoencefálica (BHE) es una barrera membranosa única que separa el tejido cerebral de la sangre circulante. En el SNC, los capilares sanguíneos son estructuralmente diferentes de los capilares de otros tejidos; están cubiertos por células endoteliales especiales, sin poros y selladas con uniones estrechas (Loch, G. y Koepp, J., 2010). Una de sus principales funciones es que permite la entrada de nutrientes esenciales al cerebro mientras lo protege de sustancias no deseadas, nocivas y de células que circulan en la sangre (Dorovini, K., 2015; Bernhardt, R., 2004).

#### 1.1.3.1. Unidad Neurovascular

Las células que comprenden la unidad neurovascular (UNV) (*Figura 2*) son las células endoteliales de la BHE junto a los astrocitos perivasculares, pericitos, microglía y las neuronas asociadas a las BHE. Además de las células que circulan en la sangre, incluidos los linfocitos, monocitos y neutrófilos polimorfonucleares ya que interactúan de varias formas con la superficie luminal de la BHE. Las células endoteliales de la BHE poseen una gran cantidad de sistemas de transporte específicos que conducen una variedad de solutos a través de la barrera, incluidos nutrientes y metabolitos. Muchos de estos sistemas de transporte son proteínas integrales de membrana que residen en las membranas plasmáticas luminal y/o abluminal. En varios estados fisiopatológicos en los que uno o más componentes de la UNV están alterados, el mantenimiento de una BHE estrecha puede reducirse o perderse con la consecuencia de una BHE permeable (Dorovini, K., 2015).

Las células de la UNV interactúan en muchos niveles a través de contactos íntimos entre células, proteínas y una variedad de mecanismos de señalización intercelular para garantizar una unión cerebral óptima a través de:

1. Mantener la arquitectura cerebral
2. Proporcionar oxígeno y nutrientes a las células del cerebro y eliminar los desechos y agentes nocivos del cerebro
3. Mantener la homeostasis del agua cerebral y los electrolitos

4. Defensa contra agentes infecciosos
5. Reparar el cerebro en la medida de lo posible después de una lesión

Una forma de ilustrar como las células de la UNV trabajan juntas para apoyar la función cerebral es considerar los mecanismos involucrados en el movimiento de solutos y agua entre las células de la UNV.

Entre los solutos importantes a considerar se encuentran.

1. Nutrientes y metabolitos
2. Péptidos y proteínas
3. Xenobióticos
4. Iones y agua

#### 1.1.3.1.1. Astrocitos

Los astrocitos tienen un papel vital en el desarrollo y mantenimiento de la BHE y la UNV.

Sus funciones principales son:

- i) Desarrollo del sistema nervioso y plasticidad sináptica.
- ii) Control de la función sináptica.
- iii) Regulación del flujo sanguíneo.
- iv) Energía y metabolismo del SNC.
- v) Expresión de AQP4.

Proteína que regula el transporte de agua y que se expresa en astrocitos, desempeñando un papel importante en la neuroinflamación (Guillamón, T. *et al.*, 2015).

- vi) Metabolismo lipídico y secreción de lipoproteínas.

Las lipoproteínas y el colesterol en SNC no proceden de sangre periférica, sino que son sintetizados por la glía, fundamentalmente por los astrocitos, que también sintetizan ApoE. La ApoE es la principal apolipoproteína del SNC y las lipoproteínas con ApoE glial suministran a las neuronas colesterol y otras moléculas por medio de receptores de la familia LDL. Estos receptores actúan no solo internalizando las lipoproteínas, sino también como transductores de señales ante la unión de sus ligandos. Así, las lipoproteínas con

ApoE estimulan el crecimiento axonal en SNC, y el colesterol unido a lipoproteínas con ApoE participa en la sinaptogénesis. Además, la ApoE tiene efectos antiinflamatorios y de protección frente a la apoptosis. En definitiva, los lípidos producidos por la glía, y más concretamente por los astrocitos, median funciones esenciales y su alteración podría afectar a la homeostasis del SNC. De hecho, se han descrito alteraciones en la biosíntesis de colesterol cerebral y reducción de la secreción de lipoproteínas que contienen ApoE en la enfermedad de Huntington, tanto en seres humanos como en modelos animales. También la relación entre la enfermedad de Alzheimer y la ApoE ha sido ampliamente estudiada, ya que la herencia del alelo  $\epsilon 4$  de la ApoE es un factor de riesgo para padecer dicha enfermedad (Guillamón, T., *et al.*, 2015).

#### 1.1.3.1.2. Pericitos

Estas células se caracterizan por tener un núcleo grande y unas extensiones citoplasmáticas que se despliegan envolviendo al capilar y simultáneamente están en contacto con las células endoteliales. Los pericitos no solo son células de soporte de la estructura vascular, sino que también contribuyen a la estabilización de los capilares, al mantenimiento de su homeostasis y a la remodelación y maduración de estos (Guijarro, I., 2013).

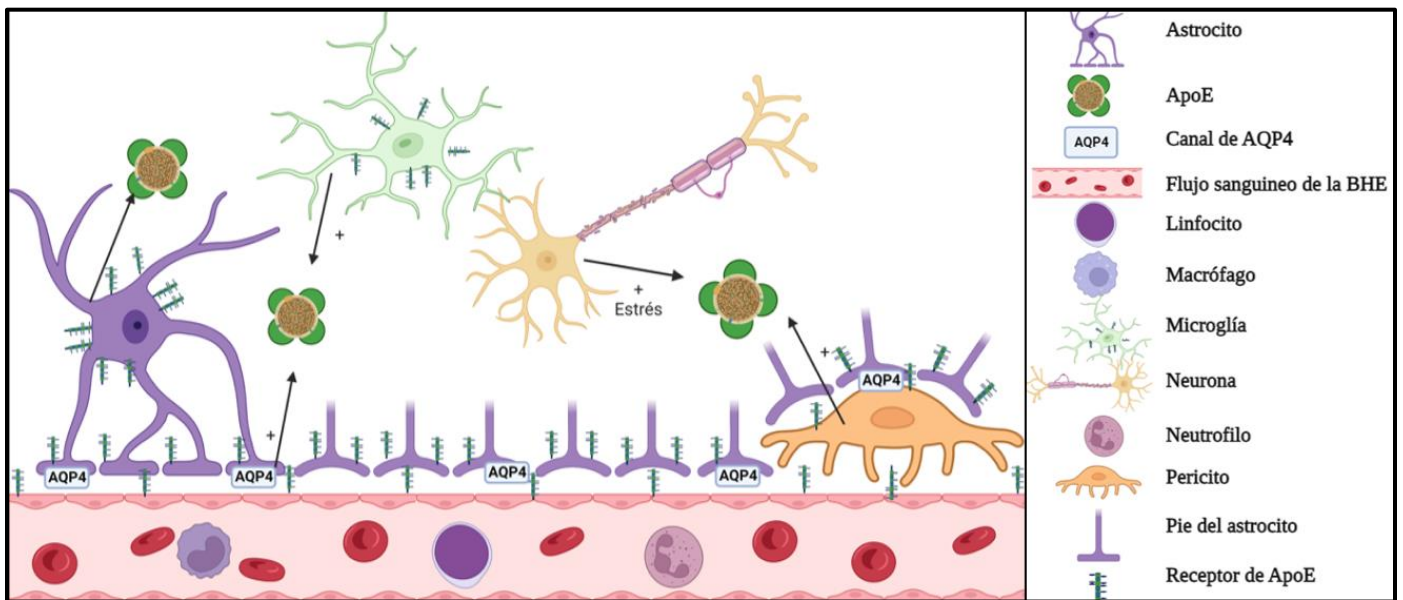
Son células multifuncionales de importancia clínica durante el desarrollo del cerebro y esenciales para el funcionamiento normal de la BHE y la UNV en el cerebro adulto. Además, cada vez hay más evidencia de que los pericitos están involucrados en varios procesos fisiopatológicos del cerebro. En el cerebro adulto sano, los pericitos parecen participar en el control de la formación de los micro vasos y en el control de la proliferación endotelial, evitando la angiogénesis. Además, los pericitos contribuyen a la producción de la lámina basal que los rodea por completo y subyace a la BHE. También se encargan de regular la homeostasis de la barrera hematoencefálica, donde se encuentran en contacto íntimo con las células endoteliales y los astrocitos. Además, son necesarios para la formación de la barrera hematoencefálica durante el periodo embrionario siendo responsables de la formación de uniones estrechas y el tráfico de vesículas entre las células endoteliales, afectando la permeabilidad vascular (Guijarro, I., 2013).

### 1.1.3.1.3. Microglía

Son macrófagos del tejido cerebral. Estas células son abundantes y representan el 10% de las células del SNC. Se distribuyen uniformemente por todo el SNC y son activados por muchas enfermedades y lesiones cerebrales. Los procesos microgliales se ponen en contacto dinámicamente con las terminales neuronales pre y postsinápticas, así como con los procesos de los astrocitos. Se cree que la microglía responde a la actividad neuronal, liberando factores que pueden modular la función neuronal, incluidas citocinas, factores tróficos, NO, ATP y glutamato (Dorovini, K. 2015).

**Figura 2**

*Representación de la Unidad Neurovascular*



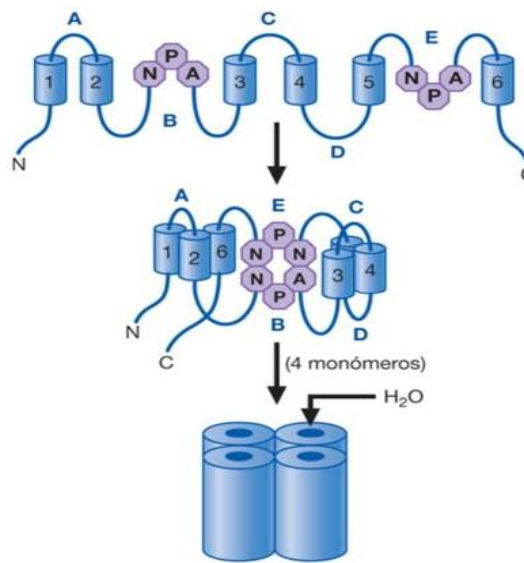
La ApoE es sintetizada por la base de los astrocitos, pericitos, microglía y células endoteliales, a excepción de las neuronas, en las que se sintetiza solamente en situaciones de estrés. Modificado de *Tai. et al. 2016*

### 1.1.3.2. Acuaporinas

Las acuaporinas son una familia de proteínas con actividad de canal permeable al agua, hasta la fecha se han encontrado al menos 13 tipos. Estas proteínas se ensamblan en la membrana plasmática como tetrámeros, cada monómero es de 30 kDa, tiene seis dominios que rodean un poro (*Figura 3*), por el cual se transporta agua en ambas direcciones, excepto las acuaporinas 3, 7 y 9, que además de agua, también transportan glicerol y otras moléculas polares, siendo 2 llamadas acuagliceroporinas. Se encuentran múltiples formas de acuaporina (AQP) en el cerebro, incluidas AQP 1, 3, 4, 5, 8, 9 y 11 (Dorovini, K., 2015).

**Figura 3**

*Estructura de las acuaporinas*



Las acuaporinas tienen seis dominios transmembrana y las terminaciones NH<sub>2</sub> y COOH son intracelulares. Las asas B y E contienen cada una una secuencia de asparagina-prolina-alanina (NPA). Las acuaporinas se pliegan con dominios transmembrana 1, 2 y 6 muy cercanos, y dominios transmembrana 3, 4 y 5 en yuxtaposición. Las asas B y E penetran al interior de la membrana y las secuencias NPA se alinean para crear un poro a través del cual se difundirá agua. Muy probablemente las acuaporinas forman un oligómero tetrámero. *Fuente: Goodman y Gilman, 2015*

#### 1.1.3.2.1. Acuaporina 4

El gen de la acuaporina 4 humana (AQP4) se codifica en el cromosoma 8. La AQP4 está presente en una densidad muy alta en las membranas plasmáticas de los pies de los astrocitos donde los astrocitos están en íntima proximidad con la superficie de la BHE (Dorovini, K., 2015).

Los tetrámeros de AQP4 se encuentran en la membrana, formando matrices ortogonales de partículas (MOPs), estos MOPs parecen ser cruciales para la toxicidad del complemento, ya que los MOPs se unen a C1q (Dorovini, K., 2015).

La AQP4 tiene dos isoformas: AQP4-M1 y AQP4-M23. La isoforma M23 es la más corta de las AQP4 y crea MOPs, contrario a M1 que es un tetrámero individual y no crea MOPs. Se expresa principal y abundantemente en cerebro y en menor proporción en músculo esquelético, actuando en conjunto con canales de potasio y bicarbonato para regular la homeostasis del agua y la presión osmótica extracelular. Ha sido relacionada con la eliminación del líquido intracerebral durante el edema vasogénico. Existen publicaciones que le atribuyen un papel en el edema citotóxico, la isquemia y hasta participación como control de excitación en la epilepsia, siendo necesarios más estudios que confirmen esto (Arias, N. y Valencia, D., 2014).

#### 1.1.4. Mielinización

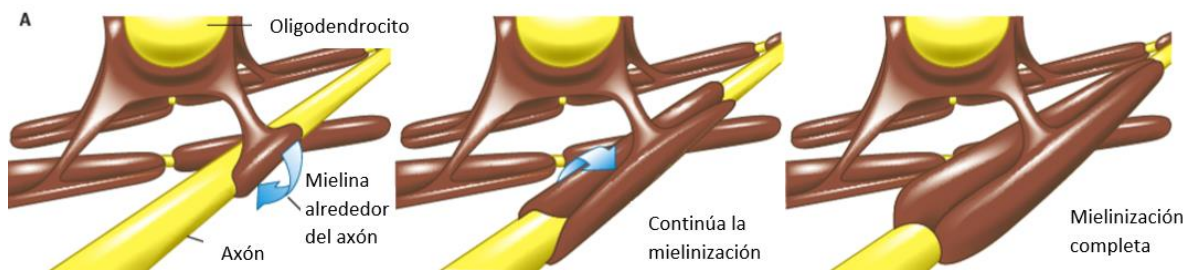
La mielina está presente en todo el Sistema Nervioso y está particularmente concentrada en áreas donde hay principalmente axones. En el SNC, la mielina está formada por una membrana plasmática de células conocidas como oligodendrocitos, mientras que en el SNP está constituida por otras llamadas células de Schwann (Bermejo, P. *et al.* 2011).

La membrana mielínica se enrolla y se hace compacta alrededor de las fibras nerviosas, lo que da lugar a una estructura multilaminar y segmentaria, es decir, cada segmento de mielina está formado por un oligodendrocito o una célula de Schwann, por lo que facilita la transmisión de los impulsos nerviosos en los axones de las neuronas (*Figura 4*). La mielina esta compuesta de diversas proteínas y de lípidos que aproximadamente son un 70% del

peso seco en el SNC mientras que en el SNP son de un 90%. Los principales lípidos componentes de la mielina son el colesterol, glicerofosfolípidos y esfingolípidos (Martínez, A., 2014).

#### Figura 4

##### Proceso de mielinización



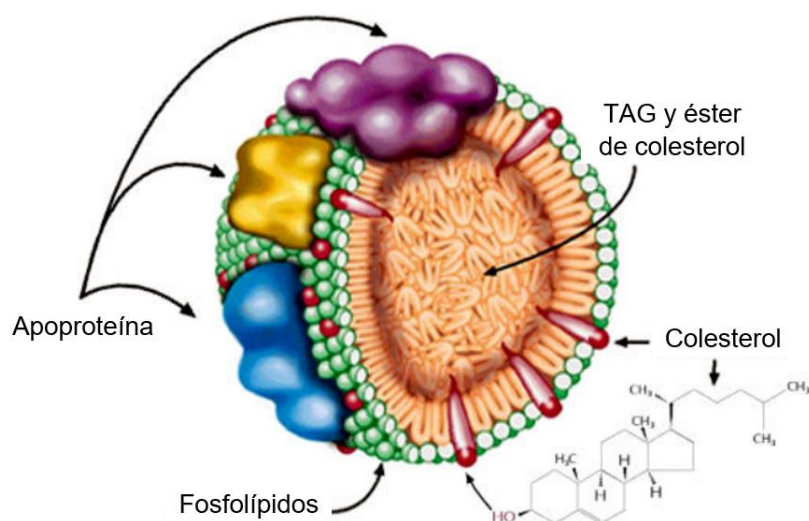
Esquema general que describe el proceso de mielinización por los oligodendrocitos. *Fuente: Sepúlveda, J., 2012*

## 2. Lipoproteínas

Las lipoproteínas son macromoléculas cuya función es empaquetar los lípidos insolubles en el medio acuoso del plasma y transportarlos desde el intestino y el hígado a los tejidos periféricos y, desde éstos, devolver el colesterol al hígado para su eliminación del organismo en forma de ácidos biliares fundamentalmente. Las lipoproteínas plasmáticas (Figura 5) constituyen un sistema poli disperso y heterogéneo de partículas de morfología casi esférica, que tienen un núcleo hidrófobo formado por lípidos no polares, es decir, colesterol esterificado (CE) y triacilglicéridos (TAG), y por una capa superficial hidrófila que contiene colesterol no esterificado, fosfolípidos (FL) y unas proteínas específicas denominadas apoproteínas (Brandan, N., *et al.*, 2006).

### Figura 5

#### Estructura de las lipoproteínas



Las lipoproteínas están conformadas por un núcleo hidrófobo y por una capa superficial hidrófila.  
Fuente: Brandan, N. *et al.*, 2006



## 2.1 Clasificación

Las lipoproteínas se clasifican en función de su densidad, como se muestra en la *Tabla 2*. La densidad de las diferentes lipoproteínas viene en buena parte condicionada por su tamaño y por su relación lípido-proteína. Así, las lipoproteínas menos densas son las más grandes y con mayor contenido en lípidos. De mayor a menor tamaño tenemos, quilomicrones, Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), Lipoproteínas de densidad baja (LDL), Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y Lipoproteínas de densidad alta (HDL) (Errico, T. *et al.*, 2013).

**Tabla 2**

*Clasificación de las lipoproteínas*

<b>LIPOPROTEÍNA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>QUILOMICRONES</b>	Partículas más grandes y menos densas, con menor proporción proteica y con gran componente lipídico (TAG)	Transporte de TAG y su suministro a tejidos
<b>VLDL</b>	Partículas grandes, poco densas y muy ricas en TAG	Transporte de TAG y su suministro (en forma de ácidos grasos) a los tejidos muscular y adiposo
<b>IDL</b>	Partículas más pequeñas y densas. Presentan menor proporción de TAG con respecto al colesterol	Son capturadas a nivel hepático por ApoE, mientras que la mitad son convertidas en LDL por medio de la lipasa hepática (LH)
<b>LDL</b>	Caracterizadas por su contenido ApoB-100 y compuestas por ésteres de colesterol	Transporte y entrega de colesterol a las células, incluyendo tejidos periféricos e hígado
<b>HDL</b>	Caracterizadas por su contenido en ApoA-I, compuestas por ésteres de colesterol	Transporte transverso del colesterol, inhibición de la modificación oxidativa de las LDL, capacidad antiinflamatoria y antitrombótica ApoA-I facilita la salida del exceso de fosfolípidos y colesterol intracelular

Clasificación de las lipoproteínas de acuerdo con sus características como la densidad y su función. *Fuente: Errico, T., et al., 2013*

## 2.2. Apolipoproteínas

Las proteínas asociadas a las lipoproteínas se denominan apolipoproteínas. Las Apolipoproteínas son anfipáticas por lo que pueden relacionarse con el componente lipídico de las lipoproteínas y con el entorno. La mayoría actúan como detergentes y desempeñan un papel fundamental para determinar y estabilizar el tamaño y estructura de las partículas de las lipoproteínas. Igualmente, actúan en los ligandos de los receptores celulares, o como cofactores para las enzimas implicadas en el metabolismo de las lipoproteínas (Errico, T. *et al.*, 2013).

### 2.2.1. Apolipoproteína E (ApoE)

La apolipoproteína E es una glicoproteína polimórfica que interactúa con los receptores de lipoproteínas (*LRP-Receptor Related Protein*) o receptores ApoE y los receptores de lipoproteínas de baja densidad (receptores LDL). Cuando las lipoproteínas se unen al receptor comienza la captación y degradación de lípidos por parte de la célula, lo que permite la utilización del colesterol contenido en las lipoproteínas, produciéndose una autorregulación intracelular (Moreno, A., Cartagena, A. y Mora, G., 2006).

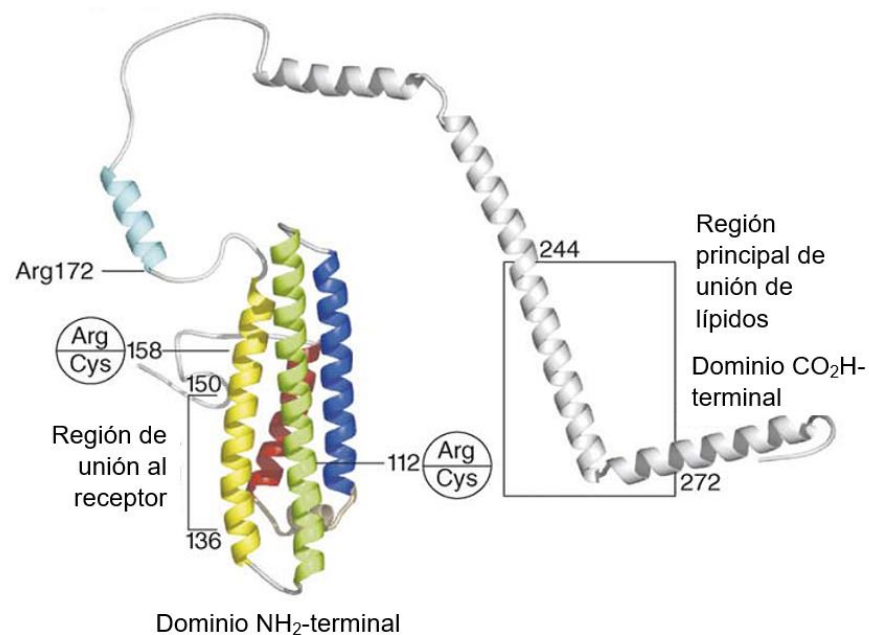
La ApoE es una proteína plasmática rica en arginina. Se sintetiza principalmente en las células parenquimatosas del hígado, bazo, pulmón, ovario, riñón y dentro del sistema nervioso central, ApoE se expresa en los astrocitos, pericitos y músculo liso, pero está fuertemente regulada por la microglía (Riphagen J. *et al.*, 2020).

ApoE (OMIM 107741) está codificada por el gen APOE que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 19 en el locus 19q13.32. Hay dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) comunes del gen APOE: 388 T > C (rs429358) y 526C > T (rs7412). Tres haplotipos ( $\epsilon 2(388\text{ T}-526\text{ T})$ ,  $\epsilon 3(388\text{ T}-526\text{ C})$ ,  $\epsilon 4(388\text{ C}-526\text{ C})$ ) y seis genotipos ( $\epsilon 2/\epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 2/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/\epsilon 4$ ,  $\epsilon 4/\epsilon 4$ ) pueden estar formados por estos SNPs (Wu, H. *et al.*, 2020). El gen APOE está constituido de cuatro exones y tres intrones, donde el exón 4 es el que contiene las partes funcionales que hacen establecer la diferencia entre las distintas apolipoproteínas

(Moreno, *et al.* 2006). APOE está compuesto de 3597 nucleótidos que codifican para una proteína de 299 aminoácidos con un peso molecular de 34,2000 Daltons. La ApoE posee una estructura secundaria, tiene dos dominios, uno amino terminal y otro carboxiterminal (*Figura 6*) (Moreno, A., Cartagena, A. y Mora, G., 2006). La isoforma E2 presenta Cys112 y Cys158, mientras que la E3 está constituida por Cys 112 y Arg 158, por último, la E4 presenta Arg112 y Arg158 (Tai, *et al.* 2016).

### Figura 6

*Estructura proteica de ApoE*



Contiene dos dominios estructurales plegados de forma independiente: el dominio N-terminal está plegado como un haz con cuatro hélices antiparalelas y el C-terminal es totalmente una  $\alpha$  hélice.  
*Fuente: Hatters, D., Peters, C. y Weisgraber, K., 2006*

#### 2.2.1.1. Interacción de ApoE con otras proteínas

En el SNC, la APOE es sintetizada principalmente por los astrocitos y, en determinadas circunstancias, también es producida por la microglía y las neuronas. La reserva periférica de APOE plasmático se produce principalmente en el hígado y, en menor medida, en la glándula suprarrenal y los macrófagos. Esta síntesis a nivel SNC y periférico, facilita la

interacción de ApoE con múltiples proteínas (*Tabla 3*), lo que permite que ApoE participe en diferentes cascadas de señalización y por lo tanto que tenga innumerables funciones tanto a nivel de SNC como en la periferia. En el SNC, ApoE participa en la inmunomodulación, transducción de señales, regulación de la homeostasis proteica y plasticidad sináptica, mientras que, en la periferia, además de regular el metabolismo de los lípidos, la ApoE tiene un papel clave en el control de la función cardiovascular y la inflamación sistémica (Williams, T., Borchelt, D. y Chakrabarty, P., 2020).

ApoE actúa como un ligando para los receptores LDL, LRP, VLDL, ApoER2, proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) (*Figura 7*), y estudios recientes sugieren que también tiene una alta afinidad para desencadenar el receptor expresado en las células mieloides 2 (TREM2) presente en la superficie de las células microgliales que participan en la fisiopatología de los trastornos neurodegenerativos (Ahmed, S., Pande, A. y Sharma, S., 2022).

ApoE interacciona con diversas proteínas para poder llevar a cabo sus múltiples funciones, por lo que, también su interacción se ve involucrada en procesos patológicos, esto lo podemos observar en la *Tabla 4* y en la *Figura 8*. Las partículas de lipoproteínas ApoE astrocíticas y plasmáticas también son estructuralmente diferentes y se cree que las primeras carecen del núcleo de éster de colesterol. Por lo tanto, es posible que la relación estructura-función de los grupos de ApoE periféricos y del SNC sean distintas, lo que sugiere que estos dos grupos de ApoE pueden actuar de forma independiente como factores de riesgo para desarrollar patologías en el SNC como demencias neurodegenerativas o metabólicas como aterosclerosis a nivel (Williams, T., Borchelt, D. y Chakrabarty, P., 2020).

**Tabla 3**

*Proteínas que interactúan con ApoE*

PROTEÍNA	GENERALIDADES
AGRN	<b>Agrín.</b> Subunidad Agrin N- terminal de 110 kDa. Participa en la regulación del crecimiento de neuritas probablemente debido a la presencia de cadenas laterales de glicosaminoglicano (GAG) de heparán sulfato de condroitina unidas a las regiones ricas en Ser/Thr y Gly/Ser. También participa en la modulación de la señalización del factor de crecimiento.
APOA1	<b>Apolipoproteína A-1.</b> Participa en el transporte inverso del colesterol de los tejidos al hígado para su excreción al promover la salida del colesterol de los tejidos y al actuar como cofactor de la Lecitina Colesterol Acil-Transferasa (LCAT).

<b>APOA2</b>	<b>Apolipoproteína A-2.</b> Puede estabilizar la estructura de HDL (lipoproteína de alta densidad) por su asociación con lípidos y afectar el metabolismo de HDL.
<b>APOA4</b>	<b>Apolipoproteína A-4.</b> Puede tener un papel en los quilomicrones y la secreción y el catabolismo de VLDL. Requerido para la activación eficiente de la lipoproteína lipasa por APOC2. Potente activador de LCAT. Componente principal de HDL y quilomicrones.
<b>APOA5</b>	<b>Apolipoproteína A-5.</b> Menor asociada con HDL y en menor medida con VLDL. También puede estar asociado a quilomicrones. Determinante importante de los niveles de TAG plasmáticos por ser un potente estimulador de la hidrólisis de TAG de LPL de APOC2 y un inhibidor de la tasa de producción hepática de VLDL-TAG. Activa mal la LCAT y no aumenta la salida de colesterol de los macrófagos
<b>APOB</b>	<b>Apolipoproteína B-100.</b> Es un componente proteico principal de los quilomicrones LDL y VLDL. Funciona como una señal de reconocimiento para la unión celular y la internalización de partículas LDL por el receptor apoB/E
<b>APOBR</b>	<b>Receptor de apolipoproteína B.</b> Receptor de macrófagos que se une a la APOB de las lipoproteínas ricas en TAG (TRL) o aun dominio similar de APOB en la lipoproteína de muy baja densidad hipertriglicéridémica (HTG-VLDL). Se une e internaliza TRL cuando está fuera del contexto del macrófago. Puede proporcionar lípidos esenciales a las células reticuloendoteliales. También podría estar involucrado en la formación de células espumosas con TRL elevado y lipoproteína remanente (RLP).
<b>APOC2</b>	<b>Apolipoproteína C2.</b> Componente de quilomicrones, VLDL, LDL, y HDL en plasma. Desempeña un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas como activador de la lipoproteína lipasa. Tanto la proapolipoproteína C2 como la APOC2 pueden activar la lipoproteína lipasa. En individuos normolipidémicos, se distribuye principalmente en HDL, mientras que en individuos hipertriglicéridémicos, se encuentra predominante en VLDL y LDL
<b>APOC3</b>	<b>Apolipoproteína C-3.</b> Componente de VLDL y HDL en plasma. Desempeña un papel multifacético en la homeostasis de los TAG. Intracelularmente, promueve el ensamblaje y la secreción de la lipoproteína 1 de muy baja densidad hepática (VLDL1), extracelularmente, atenúa la hidrólisis y la eliminación de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos (TRL). Deteriora la lipólisis de las TLR al inhibir a la lipoproteína lipasa y la captación hepática de las TRL por parte de los receptores remanentes.
<b>APOH</b>	<b>Beta-2- glucoproteína1.</b> Se une a varios tipos de sustancias cargadas negativamente, como heparina, fosfolípidos y sulfato de dextrano. Puede prevenir la activación de la cascada de coagulación sanguínea intrínseca al unirse a los fosfolípidos en la superficie de las células dañadas.
<b>APP</b>	<b>Proteína beta amiloide A4.</b> N-APP se une a TNFRSF21 desencadenando la activación de la caspasa y la degeneración tanto de los cuerpos neuronales (a través de la caspasa-3) como de los axones (a través de la caspasa-6)
<b>CETP</b>	<b>Proteína de transferencia de éster de colesterol.</b> Participa en la transferencia de lípidos neutros, incluidos los ésteres de colesterol y los TAG, entre las partículas de lipoproteínas. Permite el movimiento neto de éster de colesterol de HDL a VLDL y el transporte equimolar de TAG de VLDL a HDL. Regula el transporte inverso del colesterol, mediante el cual se elimina el exceso de colesterol de los tejidos periféricos y se devuelve al hígado para su eliminación
<b>GPC1</b>	<b>Glicoproteína-1.</b> Proteoglicano de la superficie celular que contiene sulfato de heparán. Se une a través de las cadenas laterales de sulfato heparán, al colágeno alfa-4 y participa en la mielinización de las células de Schwann. Puede actuar como un catalizador para aumentar la tasa de conversión de la proteína priónica PRPN(C) en PRNP (Sc) mediante la asociación (a través de las cadenas laterales de sulfato heparán con ambas formas de PRPN, dirigiéndolas a las balsas lipídicas y facilitando su interacción.
<b>GPIHBP1</b>	<b>Proteína 1 de unión a lipoproteína de alta densidad anclada a glicosilfosfatidilinositol.</b> Desempeña un papel clave en el procesamiento lipolítico de los quilomicrones. Requerido para el transporte de la LPL a la luz capilar
<b>HSPG2</b>	<b>Proteína central de proteoglicano de sulfato heparán específica de la membrana basal.</b> Componente integral de las membranas basales. Componente de la membrana basal glomerular (GBM), responsable de la carga electrostática negativa fija de la membrana, y

	que proporciona una barrera que es tanto selectiva en tamaño como en carga. Sirve como sustrato de unión para las células. Juega papeles esenciales en la vascularización. Crítico para el desarrollo normal del corazón y para regular la respuesta vascular a la lesión. También se requiere para el desarrollo de cartílago avascular
<b>LCAT</b>	<b>Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa.</b> Enzima central en el metabolismo extracelular de las lipoproteínas plasmáticas
<b>LDLR</b>	<b>Receptor de lipoproteínas de baja densidad.</b> Se une a LDL, la principal lipoproteína del plasma que transporta el colesterol, y lo transporta al interior de las células por endocitosis. Para ser internalizados, los complejos receptor-ligando primero deben agruparse en hoyos recubiertos de clatrina.
<b>LPA</b>	<b>Apolipoproteína A.</b> La ApoA es el componente principal de la lipoproteína A (LPA). Tiene actividad de serina proteinasa y es capaz de auto proteólisis. Inhibe el activador 1 del plasminógeno de tipo tisular. LPA puede ser un ligando para megalin/Gp330. Pertenece a la familia de las peptidasas S1. Subfamilia de plasminógenos.
<b>LPL</b>	<b>Lipoproteína lipasa.</b> Hidrólisis de TAG de los quilomicrones circulantes y de VLDL. La unión a proteoglicanos de sulfato de heparina en la superficie celular es vital para la función. La APOC2, actúa como coactivador de la actividad de LPL en presencia de lípidos en la superficie luminal del endotelio vascular. Pertenece a la superfamilia AB. Familia de las lipasas
<b>LRP1</b>	<b>Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad.</b> Receptor endocítico implicado en la endocitosis y en la fagocitosis de células apoptóticas. Requerido para el desarrollo embrionario temprano. Participa en el aclaramiento plasmático de remanentes de quilomicrones. Puede modular eventos celulares, como el metabolismo de APP, la señalización intracelular dependiente de quinasa, la señalización calcio neuronal y la neurotransmisión.
<b>LRP8</b>	<b>Proteína 8 relacionado con el receptor de lipoproteínas de baja densidad.</b> Receptor de superficie celular para Reelin (RELN) y ligandos que contienen ApoE. Participa en la transmisión de la señal extracelular de RELN a los procesos de señalización intracelular. RELN actúa a través del receptor VLDL (VLDLR) y LRP8 para regular la fosforilación de tirosina DAB1 y la función de microtúbulos en las neuronas. Mayor afinidad por Reelin que por VLDLR. Componente clave en la vía Reelin que gobierna la formación de capas neuronales en el cerebro anterior durante el desarrollo embrionario.
<b>MAPT</b>	<b>Proteína Tau asociada a microtúbulos.</b> Promueve el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos y podría estar involucrado en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad neuronal. El extremo C se une a los microtúbulos axonales, mientras que el extremo N se une a los componentes de la membrana plasmática neural, lo que sugiere que Tau funciona como proteína conectora entre ambas.
<b>MTTP</b>	Subunidad grande de la proteína microsómica de transferencia de triacilglicéridos. Cataliza el transporte de TAG, ésteres de colesterol y fosfolípidos. Necesario para la secreción de lipoproteínas plasmáticas que contienen ApoB
<b>PPARA</b>	<b>Receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas.</b> Factor de transcripción activado por ligando. Regulador clave del metabolismo de los lípidos. Activado por el ligando endógeno 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina. Activado por oleiletanolamida, un lípido natural que regula la saciedad. Receptor para proliferadores de peroxisomas como fármacos hipolipemiantes y ácidos grasos. Regula la vía de beta oxidación peroxisomal de los ácidos grasos. Funciona como activador de la transcripción de los genes ACOX1 y P450.
<b>SDC1</b>	<b>Sindecano-1.</b> Proteoglicano de la superficie celular que contiene heparán sulfato y condroitín sulfato y que une el citoesqueleto a la matriz intersticial. Regula la biogénesis de exosomas
<b>SORL1</b>	<b>Receptor relacionado con sortilina.</b> Receptor endocítico multifuncional, que puede estar implicado en la captación de lipoproteínas y proteasas. Se une a LDL, la principal lipoproteína del plasma que transporta colesterol, y la transporta al interior de las células por endocitosis. Se une a la proteína asociada al receptor (RAP). Podría desempeñar un papel en la interacción célula- célula. Involucrado en el tráfico de APP hacia y desde el aparato de Golgi. Probablemente actúa como un receptor de clasificación que protege a la APP del tráfico hacia el endosoma tardío y del procesamiento de beta amiloide



**Tabla 4**

*Enfermedades relacionadas con ApoE y su interacción con otras proteínas*

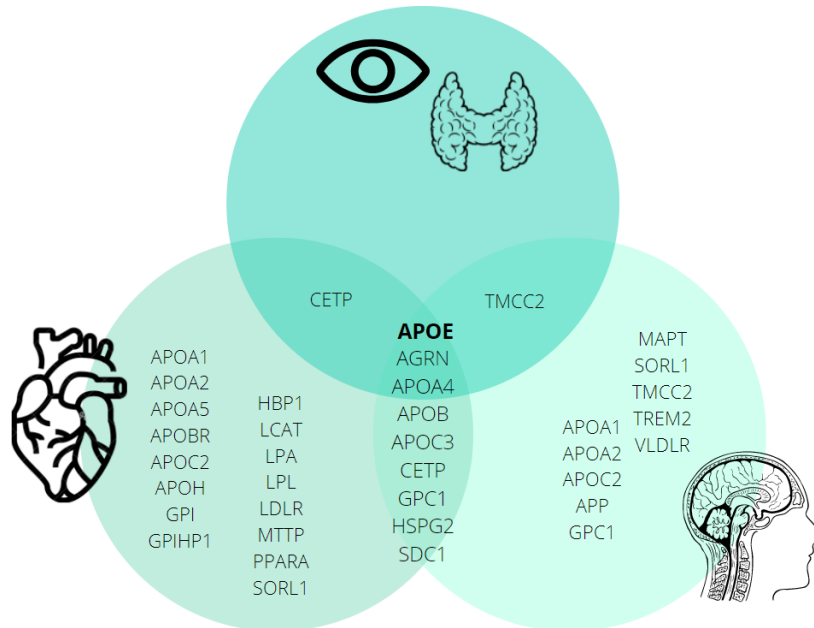
<b>Sistema involucrado</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Proteínas involucradas</b>
<b>Cardiovascular</b>	Ateroesclerosis	APOB, APOA1, APOE, CETP, LPA, APOBR
	Enfermedad aórtica	APOE, LPA
	Enfermedad arterial coronaria	APOB, APOA1, APOE, LPA
	Enfermedad metabólica	APOB, APOA1, APOE, SORL1, APP, LDLR, APOC3, LPL, APOA2, MTPP, APOA4, APOC2, GPC1, HSPG2, AGRN, SDC1, PPARA, APOA5, GPIHBP1
	Enfermedad vascular	CETP, APOH, APOB, APOA1, APOE, LPA
	Hipercolesterolemia familiar	APOH, APOB, APOA1, APOE, LPA
	Hiperlipidemia familiar	APOB, APOA1, APOE, LPL, LDLR, APOA5, APOC2, GPIHBP1
	Hipolipoproteinemia	APOB, APOA1, MTPP, LCAT
	Infarto al miocardio	APOA1, APOE
	Trastorno metabólico hereditario	APOC3, APOB, APOA1, APOE, LPL, PPARA, APOA5, APOC2, GPIHBP1
	Trastorno metabólico de lípidos	APOC3, APOB, APOA1, APOE, LPL, MTPP, LDLR, LCAT, APOC2, APOC3, APOA5, GPIHP1
	Obesidad abdominal-síndrome metabólico	APOC3, LPL
	Amiloidosis	APOA1, APOE, SORL1, APP, TMCC2, APOC3, APOA2, APOA4, APOC2, GPC1, HSPG2, AGRN, SDC1
<b>Sistema Nervioso</b>	Angiopatía amiloide cerebral	APOE, APP, TMC2, GPC1, HSPG2, AGRN, SDC1
	Demencia con cuerpos de Lewy	APOE, APP, MAPT, TMCC2
	Demencia vascular	APOE, APP
	Enfermedad de Alzheimer	APOE, SORL1, APP, MAPT, TREM2, TMCC2, HSPG2
	Enfermedad Sistema Nervioso	APOB, APOA1, APOE, SORL1, APP, MAPT, TREM2, VLDLR, TMCC2
<b>Otras</b>	Carcinoma medular de la glándula tiroides	APOE, APOA4
	Diabetes Mellitus Tipo 2	APOE, HSPG2
	Enfermedad degenerativa del ojo	CETP, APOB, APOE
	Síndrome de Down	APOE, APP, TMCC2

Proteínas y receptores relacionadas con ApoE y su papel en diferentes enfermedades clasificadas de acuerdo con el sistema en el que se involucran. *Fuente: Mondragón Marín Nancy. Elaboración propia. Tomado de String.org*



**Figura 8**

*Diagrama de relación entre ApoE y su interacción con otras proteínas*



En el centro del diagrama se tiene a la ApoE y a otras proteínas involucradas en enfermedades del SNC, cardiovasculares, ópticas o de tiroides. En el lado inferior izquierdo, se encuentran las proteínas que están involucradas en enfermedades cardiovasculares, mientras que de lado derecho están las proteínas que participan a nivel de SNC. *Fuente: Mondragón Marín Nancy. Elaboración propia. Tomado de String.org*

#### 2.2.1.2. Relación de ApoE con el Sistema Vascular

La unidad estructural y funcional del sistema vascular es la célula endotelial; ésta presenta características especiales, ya que a través de ella se lleva a cabo el intercambio de gases (oxígeno y dióxido de carbono) y de sustancias nutritivas. Dentro del SNC los capilares son clasificados como continuos, pero poseen células endoteliales con características morfológicas, bioquímicas y funcionales especiales que forman la barrera hematoencefálica, propiedad única y distinguible de las otras células del cuerpo (Cortés, A. y Pacheco, P., 2013).

Los datos convincentes pero limitados, respaldan que APOE4 induce fugas en la vasculatura cerebral (VC) en humanos. En un estudio realizado por Mariëlle Poels y *co/s.* (2010), se basaron en el Rotterdam Scan Study, un estudio de cohorte basado en la

población en curso que investiga los cambios cerebrales relacionados con la edad, en donde se asoció a APOE4 con microhemorragias independientemente de la edad. APOE4 también modula la función de la VC ya que la vasorreactividad es menor en los portadores de APOE4 más jóvenes y en los adultos mayores. Además, en adultos mayores, APOE4 indujo a déficits cognitivos que se ven amplificados por la hipertensión y con una baja vasorreactividad del CO<sub>2</sub>.

Existe una íntima asociación bidireccional entre el flujo sanguíneo cerebral (FSC) y el metabolismo neuronal. El FSC asegura suficiente suministro de oxígeno y nutrientes, y las neuronas pueden secretar factores que influyen en el mismo. También se reportó que en adultos de mediana edad y mayores (52 a 81 años), APOE4 se asocia con un FSC más alto en función de que presentan un mayor tiempo de sedentarismo. Estos datos son consistentes con el hallazgo de que el FSC está elevado para los portadores de APOE4 en los lóbulos temporales mediales y parahipocampal izquierdo y circunvoluciones fusiformes, la última de las cuales se correlaciona positivamente con la memoria verbal. Además, con APOE4 hay un FSC inicial más alto seguido de una mayor disminución del FSC con la edad en las cortezas parietal, frontal y temporal, en el análisis longitudinal (Poels, M. *et al.*, 2010).

#### 2.2.1.3. Relación de ApoE con el Sistema Nervioso Central

Más específicamente, en el SNC, la ApoE es generada comúnmente por astrocitos y microglía, aunque también puede producirse por neuronas en condiciones de estrés celular. ApoE media la unión de lipoproteínas o lípidos complejos con receptores específicos de la familia LDLR, permitiendo su internalización y la utilización de estos lípidos para funciones celulares esenciales, como la reparación de membranas o de la mielinización axonal (*Figura 9*) (Kanekiyo, T., Xu, H. y Bu, G., 2014).

Citando a Riphagen, J., y cols. (2020) en donde estudiaron la relación de los genotipos de APOE y su papel en la disfunción de la BHE por medio de la inflamación en la Enfermedad de Alzheimer (EA), reportan que una combinación de niveles elevados de IL-6 y la disfunción de BHE se asocia con una mayor patología de EA en una población con riesgo de problemas vasculares (portadores de ε4). Lo reportado en la literatura sobre APOE, es

que inicialmente fue conocido por su papel en el riesgo cardiovascular antes de que fuera reconocido como un factor de riesgo importante en la EA de inicio temprano y tardío, por lo que ApoE afecta el metabolismo y el transporte de lípidos, a su vez se ha demostrado que modula la BHE de una manera dependiente de la isoforma APOE4 en estudios in vitro y post mortem en humanos (Nishitsuji *et al.*, 2011).

En varias líneas celulares se ha demostrado que ApoE3 aumenta el crecimiento y ramificación de neuritas, mientras que ApoE4 tiene el efecto opuesto. Al menos igualmente importante en el contexto de la esclerosis múltiple, ha habido varios informes que indican que ApoE está involucrado en la redistribución de lípidos después de la desmielinización. Por lo tanto, un efecto diferencial específico de las isoformas de ApoE es que no solo puede afectar la preservación de los axones sino también el proceso de remielinización. En consecuencia, los primeros informes basados en la evaluación clínica de la gravedad de la enfermedad mostraron ciertas tendencias hacia un curso más agresivo de esclerosis múltiple en portadores de ApoE4 (Fazekas, F. *et al.*, 2000).

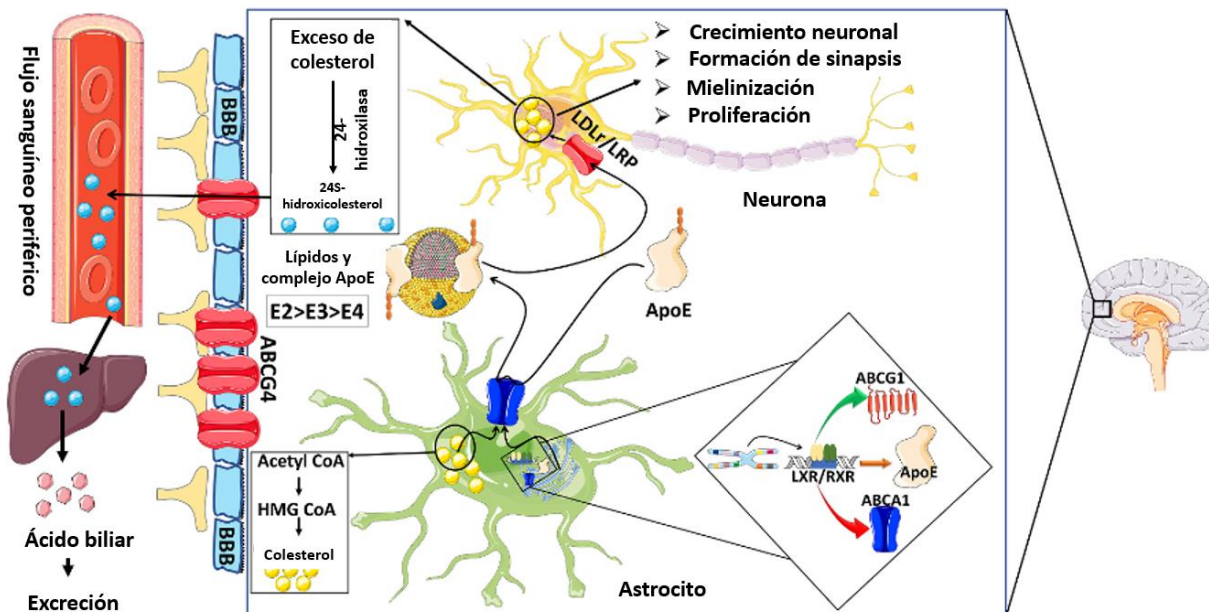
El papel de las variantes de la ApoE puede explicarse simplemente así:

- E3: Normolipidémicos
- E2: Hipercolesterolemia, Hiperlipidemia
- E4: Enfermedad de Alzheimer

Grandes estudios de cohortes han demostrado que los portadores de la variante E3 han desarrollado un mecanismo de protección contra la enfermedad neurodegenerativa; globalmente, la variante más común de ApoE es  $\epsilon 3$ . Además, los estudios clínicos han concluido que el colesterol total y el LDL en plasma son más altos en aquellos con el alelo  $\epsilon 4$  y disminuyen para  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 2$  respectivamente (Gezmis, H. *et al.*, 2021).

**Figura 9**

*Rutas de síntesis de ApoE en el cerebro y su regulación*



En el cerebro, ApoE es sintetizada por los astrocitos por medio de la regulación de LXR/RXR. Los heterodímeros LXR/RXR interactúan elementos de DNA cerca de los promotores ABCA1, ABCG1 y APOE y aumenta su expresión. Cuando los astrocitos liberan ApoE, se une a los lípidos (colesterol y fosfolípidos) a través de los transportadores ABCA1 y ABCG1) y forma partículas similares a HDL, que además interactúan con los receptores LDL, LRP1 Y HSPG. La interacción con estos receptores mejora la captación y la redistribución del colesterol y, posteriormente ayuda en el crecimiento, la proliferación, la mielinización y formación de sinapsis neuronal. El exceso de colesterol se convierte en 24S-hidroxicolesterol que cruza la BHE. Luego, llega al torrente sanguíneo sistémico, se metaboliza en ácido biliar y se excreta. Fuente: Ahmed, S., Pande, A. y Sharma, S., 2022

### 3. Enfermedades desmielinizantes

Las enfermedades desmielinizantes (ED) son aquellas en las que una anomalía metabólica de origen genético determina la formación de mielina anormal o un fracaso completo de la mielinización. Las enfermedades desmielinizantes (Tabla 5) tienen en común el ser enfermedades inflamatorias idiopáticas que destruyen selectivamente la mielina (Fernández, O. et al. 2015). Entre las enfermedades desmielinizantes se encuentran: Esclerosis múltiple (EM), Mielitis aguda recurrente y aislada (MLT), Neuritis óptica (NO), Neuromielitis óptica (NMO), Neuropatía óptica inflamatoria recurrente crónica (CRION), Encefalomyelitis aguda diseminada, Leuco-encefalitis hemorrágica aguda, entre otras (Velasco, P., Quílez, M., López, A. y Merino, A., 2011).

**Tabla 5**

*Descripción de las diversas enfermedades desmielinizantes*

<b>ENFERMEDAD DESMIELINIZANTE</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>FUENTE</b>
<b>ESCLEROSIS MÚLTIPLE</b>	La enfermedad puede iniciarse por alteraciones sensitivas, motoras, visuales, vértigo, trastornos esfinterianos o cognitivos. Cursa en forma de brotes o de forma progresiva	Pericot, <i>et al.</i> 2001
<b>ENCEFALOMIELITIS AGUDA DISEMINADA (EMAD)</b>	Se caracteriza por lesiones de componente inflamatorio. La presentación clínica es aguda/subaguda generalmente con manifestaciones polisintomáticas (afección de 2 o más sistemas funcionales). suele ocurrir con mayor frecuencia en la edad pediátrica, con una asociación temporal a enfermedades virales, vacunas y sueros inmunes	Alonso, <i>et al.</i> 2014
<b>LEUCO ENCEFALITIS HEMORRÁGICA AGUDA DE WESTON HURST (LAH)</b>	Es una rara enfermedad, con un pronóstico generalmente fatal, que se produce probablemente por una reacción autoinmune cruzada contra antígenos de mielina del sistema nervioso central.	Fontoura, <i>et al.</i> 2002
<b>MIELITIS TRASVERSA LONGITUDINAL EXTENSA (MTLE)</b>	Definida por una lesión hiperintensa en T2 que afecta al menos 3 segmentos medulares en cortes sagitales de resonancia magnética. Se la relaciona principalmente con la Neuromielitis óptica (NMO) y su espectro (NMOSD)	Carnero, <i>et al.</i> 2017
<b>NEURITIS ÓPTICA (NO)</b>	Inflamación del nervio óptico caracterizada por la presencia de disminución subaguda de la agudeza visual, déficit campimétrico y discromatopsia, asociados a dolor retro ocular que empeora con los movimientos oculares	Rodríguez, <i>et al.</i> 2022
<b>NEUROPATÍA ÓPTICA INFLAMATORIA RECURRENTE CRÓNICA (CRION)</b>	Es una neuritis óptica recurrente de etiología no conocida. Su fuerte respuesta a corticoides, que evita las recaídas, sugiere un origen inmunomediado. Se manifiesta como una neuropatía óptica subaguda y recurrente con grave afectación de la agudeza visual.	Hervás, <i>et al.</i> 2019
<b>NEUROMIELITIS ÓPTICA (NMO)</b>	Se caracteriza por ataques de neuritis óptica y mielitis, pudiendo producir ceguera, gran invalidez neurológica e incluso la muerte a corto plazo.	Lopategui, <i>et al.</i> 2008

Descripción sintomatológica de las diversas enfermedades desmielinizantes. *Fuente: Mondragón Marín Nancy. Elaboración propia.*

### 3.1 Esclerosis múltiple vs Neuromielitis óptica

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune desmielinizante del SNC, con una gran heterogeneidad en su evolución clínica; está asociada con diversos factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales. La principal característica de esta enfermedad es la aparición de lesiones o placas formadas por células residentes del SNC y células del sistema inmune, las cuales migran a través de la BHE e inducen procesos inflamatorios en el SNC (Guerrero, J., 2020). Al principio se pensaba que la NMO era una variante de la esclerosis múltiple (*Tabla 6*), pero hoy se sabe que es un trastorno distinto que se caracteriza por la presencia de anticuerpos específicos contra la acuaporina 4 (IgG-NMO). Las características clínicas de la NMO son los ataques severos de neuritis óptica y mielitis; los cuales van progresando, aumentando la incapacidad funcional. La causa es desconocida, siendo relacionada con infecciones coexistentes, vacunas y otras enfermedades autoinmunes. El descubrimiento del anticuerpo específico ha mejorado los criterios diagnósticos y abre las puertas a nuevas estrategias terapéuticas (Arias, N. y Valencia, D., 2014).

Ambas enfermedades cursan con episodios de neuritis óptica en combinación con mielitis. Sin embargo, en la NMO, estos episodios suelen ser más agudos y fuertes, lo que ayuda a la sospecha inicial de esta patología. Además, si se observa una resonancia magnética de cerebro y médula, se encuentra que la mayoría de los pacientes que presentan NMO apenas tienen daño en la sustancia blanca cerebral, pero sí tienen lesiones extensas que cubren dos o más segmentos vertebrales (Lalan, S., Khan, M. y Schlakman, B., 2012).

**Tabla 6**

*Diferencias entre NMO y EM*

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>NMO</b>	<b>EM</b>
<b>EDAD DE INICIO (APROX.)</b>	39	29
<b>SEXO (FEM : MASC)</b>	9:1	4:1
<b>COMIENZO Y CURSO</b>	80-90% recaída y 10-20% monofásico	85% recaída y 15% primaria progresiva
<b>ATAQUES</b>	Severos	Leves
<b>PROGRESIÓN SECUNDARIA</b>	Rara	Común
<b>BOC EN LCR</b>	Poco frecuente (15-30%)	Frecuente (85%)
<b>NMO-IGG</b>	Positivo	Negativo

Diferencias como la edad de inicio, sexo, seroestado, etc., entre la Neuromielitis óptica (NMO) y la Esclerosis Múltiple (EM). Fuente: *Fernández, C., 2018*

### 3.2 Neuromielitis óptica

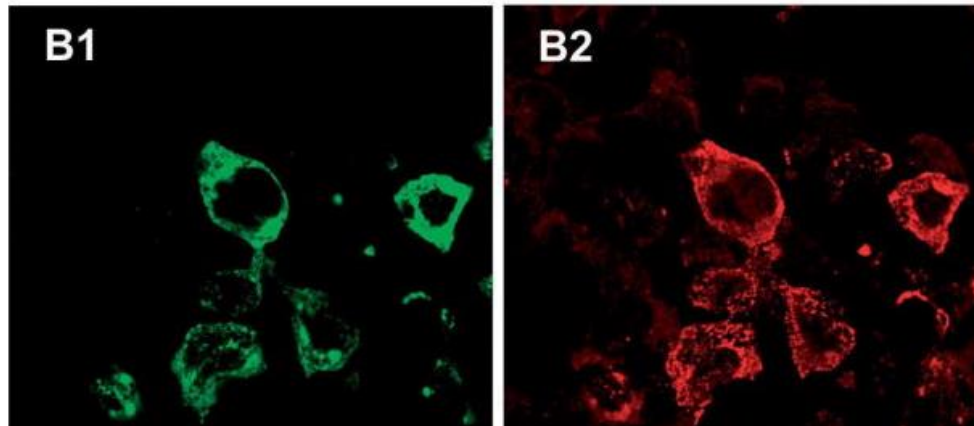
La Neuromielitis óptica (NMO) también es conocida como Síndrome de Devic, ya que fue quien lo describió a detalle en 1894; es una enfermedad inflamatoria, desmielinizante y autoinmune (Lopategui, I., Cervantes, M. y Pentón, G., 2008). Se caracteriza por ataques de neuritis óptica y mielitis, provocando gran invalidez neurológica, ceguera y hasta la muerte; estos eventos clínicos pueden ocurrir también en la esclerosis múltiple (EM), pero en la NMO son por lo general más agudos y severos (Medina, R. *et al.*, 2018).

La NMO es ocasionada por autoanticuerpos contra la acuaporina-4 (AQP4) (*Figura 10*), proteína transportadora de agua, localizada en los pies de los astrocitos en el sistema nervioso central. Estos anticuerpos son los que participan directamente en las manifestaciones clínicas de la enfermedad como son los cuadros de neuritis óptica y/o mielitis; por último, existen formas limitadas o incompletas, conocidas como trastornos del espectro de NMO (NMOSD), que generalmente son eventos únicos o recurrentes de sólo mielitis longitudinalmente extensa o bien neuritis óptica recurrente (Luna, E. *et al.*, 2017).

Estudios recientes han comunicado que los pacientes con NMO o NMOSD seronegativos presentan diferentes características clínicas a los pacientes seropositivos al anticuerpo AQP4. Estos estudios revelan que los pacientes seronegativos pueden imitar el cuadro clínico simulando la NMO seropositiva, pero implican mecanismos neuropatológicos distintos, por lo que se concluye que las respuestas al tratamiento, así como el pronóstico a largo plazo, deberán analizarse por separado de aquellos con anti-NMO seropositivos. (Luna, E. *et al.*, 2017).

## Figura 10

### *Inmunohistoquímica convencional contra AQP4*



B1: células HEK transfectadas con el gen de la acuaporina 4, clonado en el vector pEGFP-C1 (fluorescencia verde). B2: suero de un paciente con IgG-NMO positivo por inmunohistoquímica convencional (anticuerpo secundario fluorescente rojo) *Fuente: Blanco, Y. et al., 2010*

Aproximadamente, el 10-20% de los pacientes con NMOSD típica son negativos para anticuerpos anti-AQP4. El NMOSD es una enfermedad con secuelas neurológicas catastróficas, porque las manifestaciones clínicas de cada área afectada pueden llevar a discapacidad neurológica funcional grave e irreversible (*Tabla 7*). Se postula que factores como mayor edad en el momento del inicio, mayor frecuencia de recaídas, especialmente en el primer año, la gravedad y la pobre recuperación de la primera recaída, la carga de lesiones en el tronco encefálico en la resonancia y el retraso del inicio del tratamiento crónico pueden indicar un peor pronóstico (Muñoz, N. *et al.*,2022).



**Tabla 7**

*Características clínicas de la NMO*

<b>NEUROMIELITIS ÓPTICA</b>	
<b>CUADRO CLÍNICO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ NO bilateral</li> <li>➤ MLTE</li> <li>➤ Síntomas oftalmológicos                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-Dolor ocular</li> <li>-Ceguera cortical</li> <li>-Disfunción oculomotora</li> </ul> </li> <li>➤ Síntomas neurológicos                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-Paraplejia severa</li> <li>-Disfunción vesical</li> <li>-Espasmos tónicos paroxísticos del tronco y extremidades</li> <li>-náuseas</li> <li>-vómitos</li> <li>-hipersomnolencia</li> <li>-hipotermia</li> <li>-disfagia</li> <li>-pérdida de la audición</li> </ul> </li> <li>➤ Evento inicial de mielitis.</li> <li>➤ Ciertos estudios asocian la infección del virus <i>Coxsackie</i> como un antecedente a la NMO</li> <li>➤ Hipotiroidismo</li> <li>➤ Síndrome de Sjögren.</li> </ul>
<b>DIAGNÓSTICO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ NMO-IgG (73% de sensibilidad y un 91% de especificidad)</li> <li>➤ La resonancia magnética de la médula espinal con lesiones medulares en la proyección T2</li> <li>➤ Criterios para el diagnóstico.                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-Diagnóstico de NO</li> <li>-Diagnóstico de MTLE</li> </ul> </li> </ul>
<b>TRATAMIENTO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Inmunosupresores</li> <li>➤ Inmunomoduladores (AZT, RTX) *</li> <li>➤ Eventos agudos de NMO: MTPDN y PDN*</li> <li>➤ Eventos resistentes: Plasmaféresis</li> <li>➤ Aquapumorab**</li> </ul>

*\*Tratamiento para la NMO: AZT: Azatioprina, RTX: Rituximab, MTPDN: Metilprednisolona, PDN, Prednisona \*\*Tratamiento en investigación. Fuente: Arias, N. y Valencia, D., 2014*

### 3.2.1 Incidencia y prevalencia

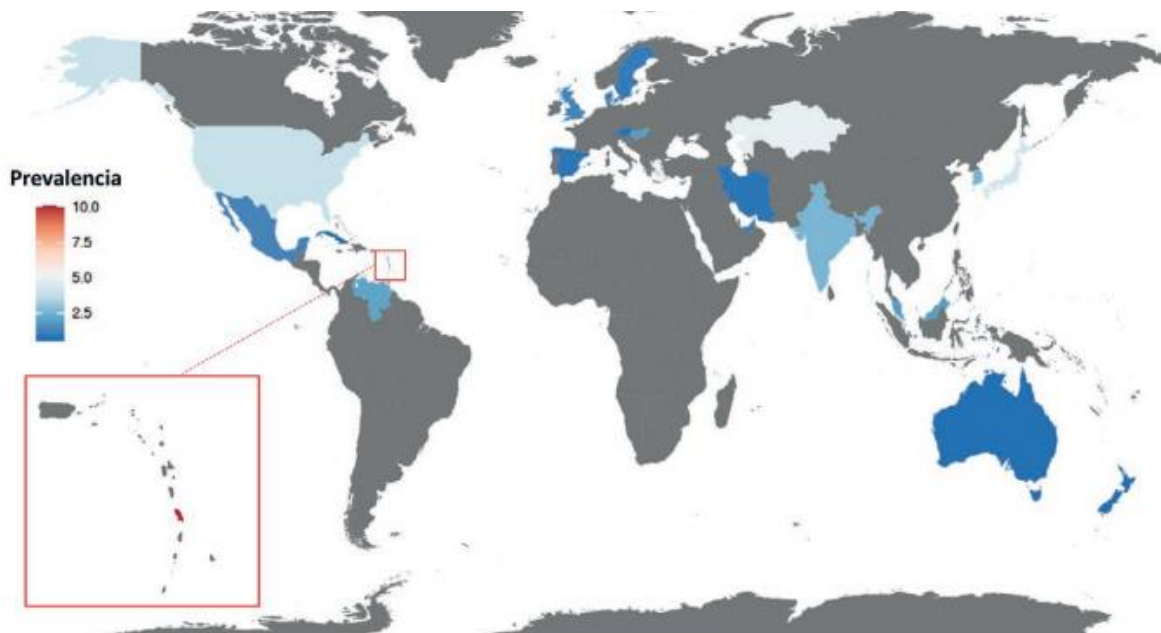
Existen pocos estudios acerca de la verdadera prevalencia e incidencia a nivel mundial de la enfermedad desmielinizante conocida como Neuromielitis Óptica o Síndrome de Devic. Hay reportes que estiman una prevalencia de entre 0.51 a 4.4 casos por cada 100,000 habitantes, y es mayor en mujeres (Medina, R. *et al.*, 2018).

Además de las discrepancias en su metodología, los datos difieren fundamentalmente en función de la distribución geográfica, con cifras de prevalencia e incidencia más elevadas en los países asiáticos y en los países con etnia de procedencia afroamericana. La prevalencia estimada del NMOSD en los países asiáticos varía desde 0.34 por cada 100,000 habitantes, hasta 4.1 en los Emiratos Árabes. En los estudios de países occidentales, cuya población es mayoritariamente caucásica (incluyendo Australia y Nueva Zelanda), las cifras disminuyen hasta situarse entre 0.7 (en Australia/Nueva Zelanda) y 1.91 en Hungría por cada 100,000 habitantes. En relación con los datos de incidencia, entre los países asiáticos, únicamente un estudio realizado en Malasia con población multiétnica informó de una incidencia de 0.39 por cada 100,000 habitantes. Sin embargo, la mayoría de los estudios occidentales mostró incidencias entre 0.063 en la región de Cataluña en España y 0.37 por cada 100,000 personas en Australia y Nueva Zelanda (*Figura 11*) (Sepúlveda, M., Arrambide, G. y Cobo, A., 2022).

En México no existen estudios que determinen la prevalencia o incidencia exacta de esta enfermedad. Un estudio realizado por médicos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” estima que la incidencia aproximada es de 1.3 casos por cada 100,000 habitantes. (Medina. R. *et al.* 2018). Citando a Flores, J y cols. (2008) “El Síndrome de Devic parece una enfermedad grave en la población mexicana debido a que es más susceptible en la población no caucásica que incluye aquellos descendientes africanos (afrocaribeños y afroamericanos, hispanos, asiáticos y americanos nativos, por lo que podría sugerirse una tasa de prevalencia provisional de alrededor de 1 por 100,000 habitantes para la NMO en los mestizos mexicanos”. En México, sobre la base de un estudio hospitalario, se estimó una prevalencia de pacientes con NMO seropositivos de alrededor de 1 por cada 100.000 habitantes (Sepúlveda, M., Arrambide, G. y Cobo, A., 2022).

## Figura 11

*Prevalencia de NMOSD según los criterios de NMOSD de 2015*



Aumentado y encuadrado en rojo las islas pertenecientes a las Antillas Menores o Pequeñas Antillas. Entre ellas, se resalta en rojo Martinica, donde se ha descrito una prevalencia de NMOSD de 10,0 (IC: 95%; 6,8-13,2) por 100.000 hab. Fuente: Sepúlveda, M., Arrambide, G. y Cobo, A., 2022.

De acuerdo con el sexo, la prevalencia e incidencia de la enfermedad fue al menos tres veces mayor en mujeres que en hombres, tanto en los estudios asiáticos de Teherán (Irán) y la isla de Penang (Malasia) en Asia, como en los estudios europeos de España, Dinamarca y Hungría. En relación con los datos epidemiológicos en función del rango de edad, el pico de prevalencia e incidencia se objetivó en los pacientes con edades comprendidas entre 40 y 59 años para ambos sexos (Sepúlveda, M., Arrambide, G. y Cobo, A., 2022).

Finalmente, los pocos estudios que ofrecen datos estratificados por el seroestado informan de cifras de prevalencia más elevadas en Asia respecto a Europa en relación con los pacientes con anti-AQP4. Las prevalencias de pacientes de NMOSD con antiAQP4 fueron de 1.99 y 3.2 en los estudios de Japón y la isla de Penang (Malasia); respectivamente, en comparación con prevalencias de 0.76, 1.2 y 1.61 por cada 100,000 habitantes en los estudios de Dinamarca, Hungría y Oxfordshire, respectivamente. El estudio realizado en

Cataluña informó de un aumento progresivo de las cifras de prevalencia de pacientes con NMOSD con antiAQP4 en paralelo con la edad, con un pico de 0.89 por cada 100,000 habitantes en edades comprendidas entre los 40 y los 59 años . Este mismo estudio mostró que los antiAQP4 son más prevalentes en mujeres que en hombres en todos los rangos de edad, especialmente en el comprendido entre los 40 y los 59 años –mujeres, 1.43 frente a hombres, 0.35. Por el contrario, si nos focalizamos en los pacientes seronegativos que tienen NMOSD, la prevalencia en hombres y mujeres fue similar para la mayoría de los rangos de edad. En relación con la incidencia acorde con el seroestado, únicamente disponemos de estudios europeos. Las incidencias de pacientes con NMOSD con antiAQP4 fueron de 0.05 en Dinamarca y de 1.15 en Hungría. El estudio en Cataluña mostró un aumento progresivo de la incidencia de pacientes con NMOSD con anti-AQP4 en paralelo con la edad, que fue de 0.062 por cada 100,000 personas en el rango de 40-59 años. De nuevo, la incidencia fue más elevada en mujeres que en hombres en todos los grupos de edad (Sepúlveda, M., Arrambide, G. y Cobo, A., 2022).

### 3.2.2 Desmielinización

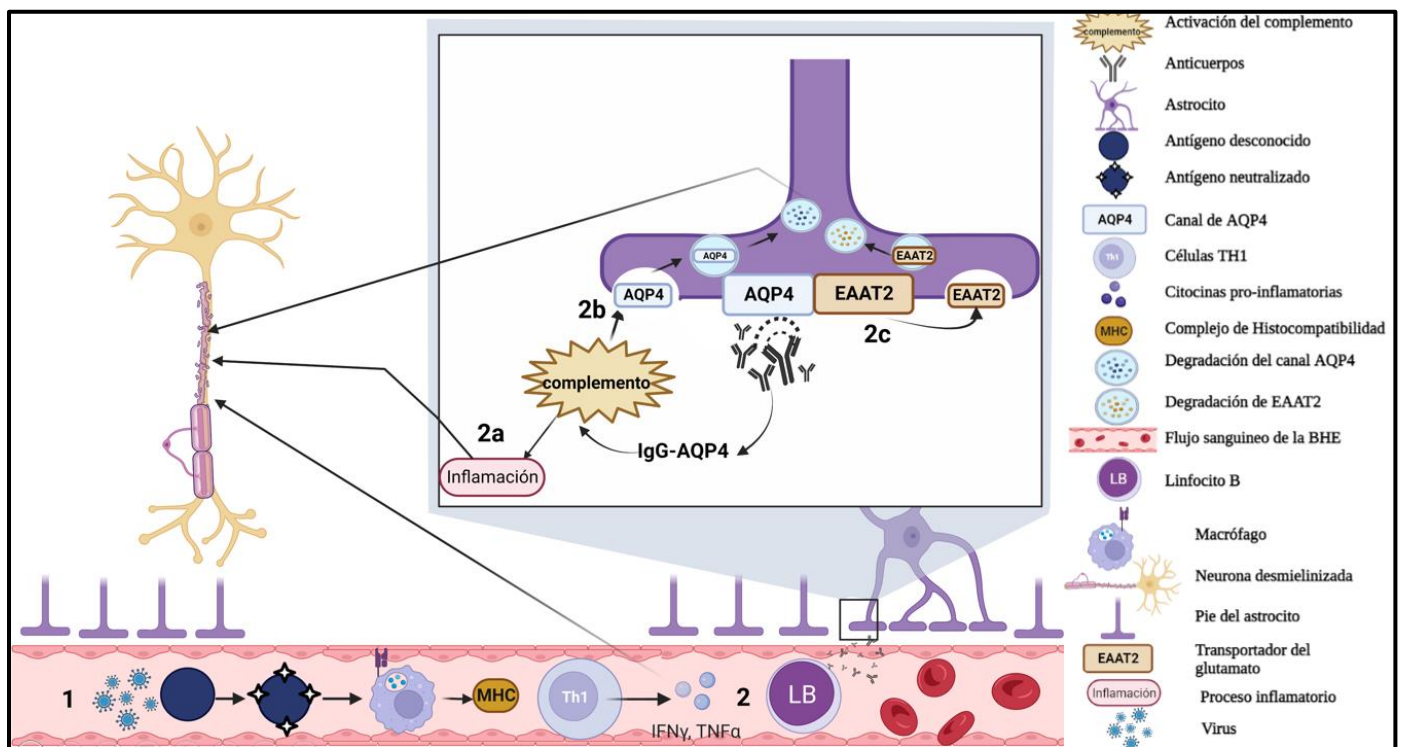
El mecanismo de la enfermedad está mediado por linfocitos B (*Figura 12 A*) que producen anticuerpos IgG dirigidos contra el canal de acuaporina 4 (AQP4), que está presente en abundancia en las prolongaciones pediculares de los astrocitos en la barrera hematoencefálica. Dichos anticuerpos desencadenan un proceso inflamatorio y consecuentemente desmielinizante localizado en el nervio óptico, médula espinal y ventrículo, entre otras (Medina, R. *et al.* 2018).

La acuaporina 4 es el blanco de los anticuerpos que muestran los pacientes con Neuromielitis óptica. En médula espinal, sea sustancia gris o blanca, típicamente muestra procesos de desmielinización con múltiples zonas de necrosis, cavitación y pérdida axonal. Las lesiones se localizan en el centro, respetando la periferia, con pérdida significativa de oligodendrocitos. Se han descrito dos tipos de lesiones; primero, aquellas con pérdida de AQP4, cursando con desmielinización y necrosis en el nervio óptico y médula espinal; y segundo, la pérdida de AQP4 sin desmielinización ni necrosis en la médula espinal y área postrema. Se han postulado dos tipos de cascadas fisiopatológicas, intentando explicar la consecuencia de la unión IgG-AQP4. De manera distinta, otros estudios observaron

diferentes patrones de pérdida de AQP4 y depósitos tanto de complemento como de inmunoglobulinas, incluso dentro de una sola lesión, concluyendo que tal vez el complemento no sea el único mecanismo de destrucción inmunológica. Informes médicos identifican NMO-IgG en pacientes, mucho antes de que comenzara la aparición de síntomas, y varios de ellos informaron del antecedente de infecciones virales (*Tabla 7*). En cuanto a las principales células afectadas, se ha descrito la pérdida de los astrocitos. Las lesiones a los astrocitos se caracterizan por la presencia del complemento e infiltrado de granulocitos que provocan necrosis (*Figura 12 B*) (Arias, N. y Valencia, D., 2014).

**Figura 12 A**

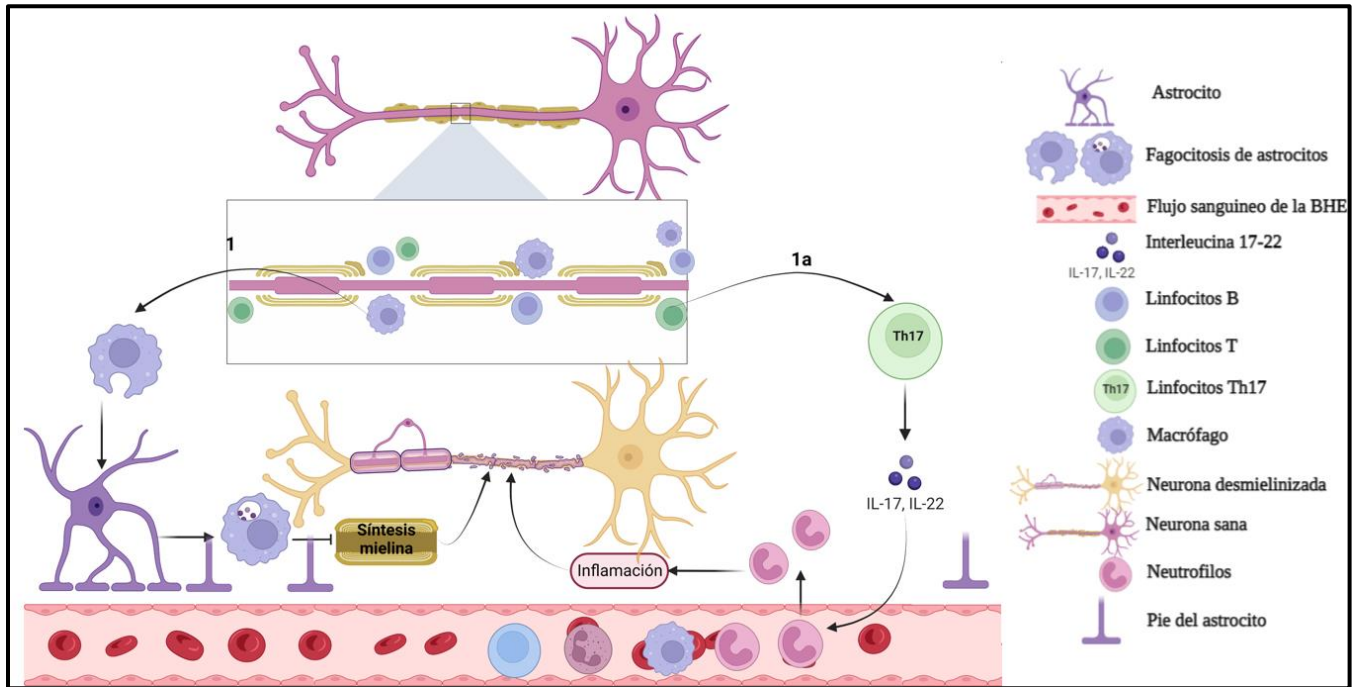
*Mecanismo de patogénesis en NMO*



1) Se inicia por la entrada de un virus o de un antígeno desconocido, en donde el antígeno es neutralizado por un macrófago. Los productos de digestión de este son llevados a la superficie, en la que forman los complejos principales de histocompatibilidad (MHC). Esta formación puede ser reconocida por algunas células TH1 que favorecen su proliferación y la consecuente expresión de factores quimiotácticos, citocinas (interleucinas, interferón, TNF, etc.) y radicales libres. 2) Los linfocitos B (LB) sintetizan anticuerpos favoreciendo la unión IgG-AQP4 provocando la activación del complemento 2a) Se desencadena un proceso inflamatorio 2b) Se favorece la endocitosis y degradación de AQP4. 2c) In vitro se ha demostrado que en la endocitosis de AQP4 también ocurre la endocitosis de EAAT2, transportador de glutamato. Todos estos procesos, conllevan a la desmielinización de las neuronas, lo que dará lugar a la enfermedad. Fuente: Mondragón Marín Nancy, Elaboración propia

## Figura 12 B

### Mecanismo de patogénesis en NMO



En las porciones activas sin mielina se encuentra un extenso infiltrado de macrófagos, eosinófilos, linfocitos B y linfocitos T. 1) La presencia de macrófagos sugiere que son los encargados de fagocitar a los astrocitos, inhibiendo la síntesis de mielina 1a) Los linfocitos T, exhiben un sesgo de TH17 que promueven la infiltración de neutrófilos a través de la IL-17 promoviendo el proceso de inflamación lo que dará lugar a la desmielinización de las neuronas.

Fuente: Mondragón Marín Nancy, Elaboración propia

## II. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades desmielinizantes, como la Neuromielitis óptica, afectan de forma primordial a la sustancia blanca del Sistema Nervioso Central. La incidencia de estas enfermedades ha incrementado de forma significativa por lo que un diagnóstico temprano podría ser fundamental para la implementación del tratamiento adecuado. La evidencia inicial de que APOE modula la BHE fue observada por Salloway y *cols.* (2002), quienes demostraron un adelgazamiento de la membrana basal en genotipos E4/4, en comparación con los pacientes con genotipo E3/3. Las alteraciones de la membrana basal pueden ser una indicación de que la BHE se está degenerando con APOE4 que conduce a un aumento de la permeabilidad (Tai, L. *et al.*, 2016). Existe la hipótesis de que las isoformas de APOE modulan la neuroinflamación de distintas formas, ya que muchas líneas experimentales han demostrado que se da una mayor respuesta inflamatoria en los portadores de APOE4 con respecto a APOE3. APOE4 induce un fenotipo neuro inflamatorio perjudicial caracterizado por niveles elevados de citocinas proinflamatorias y más bajos de antiinflamatorias promoviendo la desmielinización (García, P., 2019). De igual manera, se ha demostrado que APOE4 es un factor de riesgo vascular el cual induce a déficits en la integridad de la microestructura de la materia blanca; de igual forma se ha demostrado también un incremento del riesgo cardiovascular (RCV) en sujetos que expresan el alelo  $\epsilon 4$ . (Moreno, A., Cartagena, A. y Mora G., 2006). También existen evidencias que muestran que los portadores del genotipo E4/4 tienen mayores probabilidades de sufrir enfermedades neurológicas como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple o epilepsia (García, A., 2003; García, Y. *et al.*, 2011; Guerra, A. *et al.*, 2013). En el 2008, Shi, J. y *cols.* reportaron la asociación entre pacientes con esclerosis múltiple, APOE4 y el déficit cognitivo; por lo que, al ser una enfermedad desmielinizante, se espera que con este estudio el alelo  $\epsilon 4$  del gen APOE sea un factor de susceptibilidad para el desarrollo de Neuromielitis Óptica.

### III. OBJETIVOS

#### a) OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante la técnica de PCR-RFLP el alelo  $\epsilon 4$  del gen APOE y evaluar si es un factor de susceptibilidad para el desarrollo de Neuromielitis óptica en una población mestiza mexicana.

#### b) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

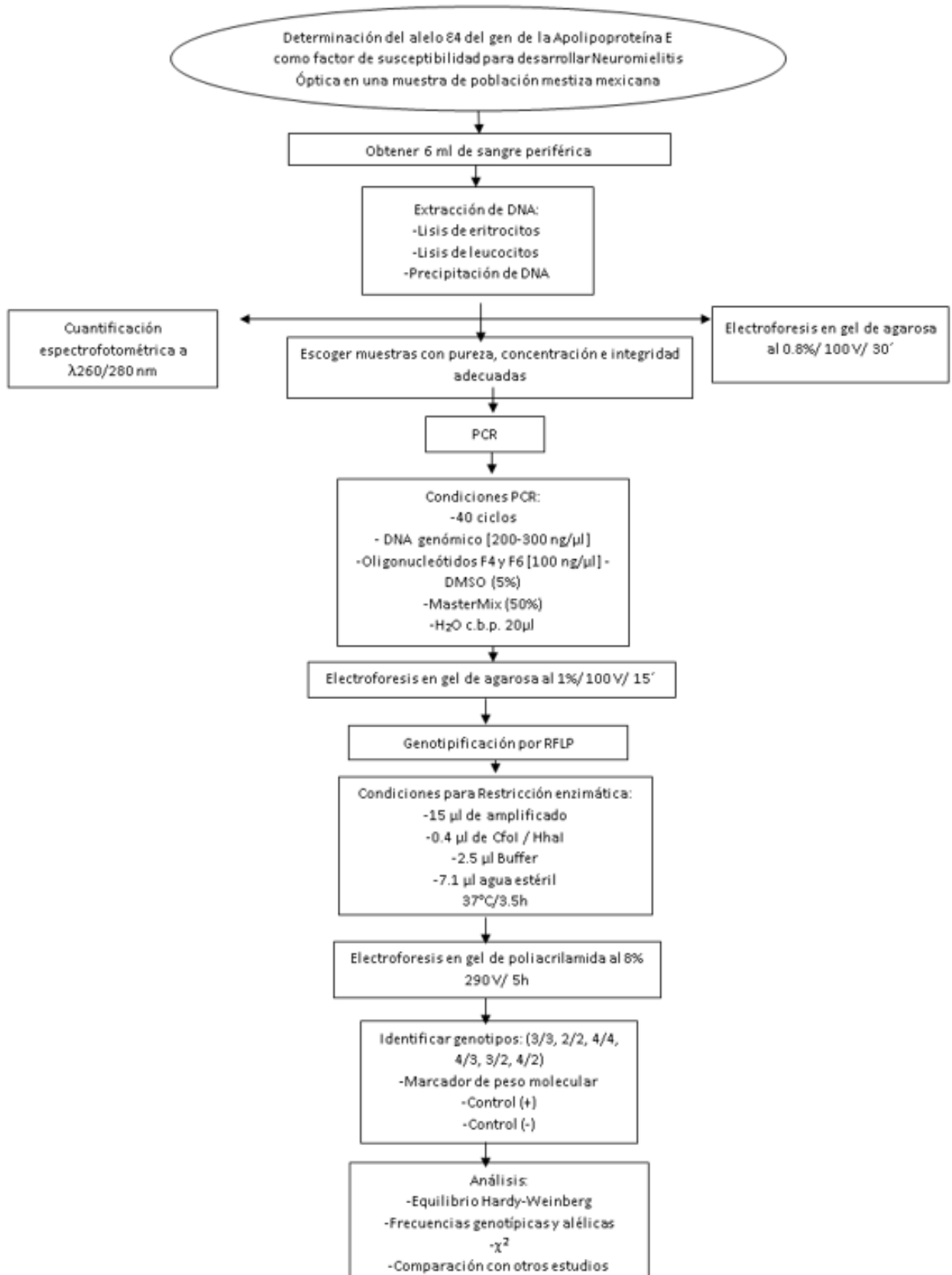
- Implementar la técnica de PCR-RFLP para la obtención e identificación de genotipos de APOE por resolución en geles de poliacrilamida.
- Determinar si existe relación entre el alelo  $\epsilon 4$  del gen APOE y la Neuromielitis óptica en la población mestiza mexicana.
- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de APOE en pacientes con NMO y los grupos control de pacientes con EM y personas sanas.
- Comparar las frecuencias obtenidas en el grupo de NMO contra los casos de EM, ED y controles.
- Establecer si existe diferencia significativa entre las frecuencias alélicas de APOE de casos con NMO y controles.

### IV. HIPÓTESIS

La presencia del genotipo  $\epsilon 4$  del gen APOE está asociado a Neuromielitis óptica en población mexicana.



## V. DISEÑO EXPERIMENTAL



## VI. METODOLOGÍA

1. Selección de muestras del banco de DNA del INNyN (*Ver Anexos 1*)
  - i. Se procesaron 264 muestras de pacientes con diagnóstico de enfermedad desmielinizante, de las cuales 82 muestras tuvieron diagnóstico definitivo de NMO (Edad inicial:  $38.9 \pm 10.2$  años) y 182 presentaron otra enfermedad desmielinizante (EI:  $33.6 \pm 12.1$  años), como 139 casos de EM [(EI:  $30.1 \pm 9.7$  años); EMRR, 104 casos, (EI:  $28.96 \pm 9.7$  años); EMSP, 30 casos. (EI:  $35.2 \pm 9.8$  años); 2 casos EMPP y 3 casos sin definir]; ML (3), CRION (9), NO (15), EMDA (1), SCA (1), MT (5); MTLE (3); MR (6); donde 32 casos de NMO fueron seropositivos para AQP4 (EI:  $39.91 \pm 11$  años) y 14 casos de NMOSD seronegativos AQP4 (EI:  $36.8 \pm 10.6$  años). Además, se cuenta con un grupo de 229 muestras de personas sin enfermedad neurodegenerativa.
2. Cuantificación del DNA
  - i. Se midió la concentración y pureza de las muestras de DNA por espectrofotometría empleando el equipo *Jenway® Genova nano*. Utilizando como blanco 3  $\mu$ l de agua inyectable (*Ver Anexos 3*)
3. Evaluación de la integridad del DNA
  - i. Se evaluaron las muestras de DNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, en donde se cargaron 2  $\mu$ l de muestra con 2  $\mu$ l de colorante de carga y 2  $\mu$ l del colorante GELRED 1X a 100V durante 20 minutos en buffer TBE 1X (Tris-EDTA-Ácido bórico) (*Ver Anexos 2 y 3*)
  - ii. Se analizaron los geles de agarosa en el transiluminador
4. Genotipificación

El análisis de genotipos se realizó por la técnica PCR-RFLP, empleando las enzimas *CfoI* o *HhaI*, las cuales se denominan como isosquizómeros. La tabla 8 muestra la secuencia del amplificado y los oligonucleótidos empleados para la reacción de PCR, mientras que en la tabla 9 se pueden observar los sitios de corte de la enzima en la secuencia del gen APOE, así como el cambio de aminoácidos de las isoformas  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ .

**Tabla 8**

Secuencia de nucleótidos del gen APOE y de los oligonucleótidos F4 y F6

<b>PRIMER F4</b>	(5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC - 3')
<b>PRIMER F6</b>	(5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA - 3')
<b>SECUENCIA DE DNA DEL AMPLIFICADO DEL GEN APOE (244BP)</b>	<p><i>F6</i> → <i>taagcttg</i><b>GCA CGG CTG TCC AAG GAG</b> CTG CAG GCG GCG CAG GCC CGG CTG GGC GCG GAC ATG GAG GAC GTG TGC GGC CGC CTG GTG CAG TAC CGC GGC GAG GTG CAG GCC ATG CTC GGC CAG AGC ACC GAG GAG CTG CGG GTG CGC CTC GCC TCC CAC CTG CGC AAG CTG CGT AAG CGG CTC CTC CGC GAT GCC GAT GAC CTG CAG AAG CGC CTG GCA <b>GTG TAC CAG GCC GGG</b><i>gcaattctgt</i> <i>F4</i> ←</p>

(Hixson, J. y Vernier, D., 1990)

**Tabla 9**

Secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción Hha I y sus sitios de corte en la secuencia nucleotídica del gen APOE

Secuencia de reconocimiento de Hha I y Cfo I	GCG <sup>^</sup> C
<b>Sitios de corte de las enzimas Hha I y Cfo I en la secuencia de DNA del gen APOE</b>	
E4 DNA <i>taagcttg</i> <b>GCA CGG CTG TCC AAG GAG</b> CTG CAG GCG <b>GCG</b> <b>CAG</b> GCC CGG CTG <b>GGC</b> 53	↓
E4 proteína Ala Arg Leu Ser Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly	
E2	<b>112</b>
E3	T
E4 <b>GCG</b> GAC ATG GAG GAC GTG <b>CGC</b> GGC CGC CTG GTG CAG TAC CGC GGC GAG GTG CAG 113	↓
E4 Ala Asp Met Glu Asp Val Arg Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln	
E3	Cys
E2	Cys
E4 GCC ATG CTC GGC CAG AGC ACC GAG GAG CTG CGG GTG <b>CGC</b> CTC GCC TCC CAC CTG 173	↓
E4 Ala Met Leu Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu	
E2	T
E3	C ↓
E4 <b>CGC</b> AAG CTG CGT AAG CGG CTC CTC CGC GAT GCC GAT GAC CTG CAG AAG <b>CGC</b> CTG 233	↓
E4 Arg Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg Arg Cys	
E3	Arg
E2	Cys
E4 GCA <b>GTG TAC CAG GCC GGG</b> <i>Gcgaattctgtg</i> 244	
E4 Ala Val Tyr Gln Ala Gly	

(Hixson, J. y Vernier, D., 1990)

**Se siguió el siguiente protocolo para la reacción de PCR de punto final**

- i) Cada reacción de PCR se preparó como se indica en la tabla 10:

**Tabla 10**

*Componentes de la reacción para PCR*

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD (µL)
<b>DNA GENÓMICO [200-300 NG/µL]</b>	[200-300 ng/µl]	2
<b>PRIMERS F4 Y F6</b>	[100 ng/µl]	1
<b>DMSO</b>	5%	1
<b>MASTERMIX</b>	50%	5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	c.b.p.	10

- ii) Los tubos se colocaron en el termociclador (*Labnet™ Termociclador MultiGene™ OptiMax*) utilizando el protocolo para APOE y se procesaron bajo las condiciones mostradas en la tabla 11:

**Tabla 11**

*Condiciones de reacción para la PCR de punto final*

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	NO. DE CICLOS
<b>DESNATURALIZACIÓN</b>	94	5 minutos	1
<b>HIBRIDACIÓN</b>	65	30 segundos	40
<b>EXTENSIÓN</b>	70	1 minuto y 30 segundos	
<b>EXTENSIÓN FINAL</b>	70	10 minutos	1

- iii) Los amplicones se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0%. Colocando 2µl de muestra con 2µl de colorante de carga y 2µl del colorante GELRED 1X a 100V durante 10 minutos en buffer TBE 1X (Tris-EDTA-Ácido bórico)

**Para la genotipificación por RFLP se siguió el siguiente protocolo**

- i) Cada reacción RFLP se preparó como se indica en la tabla 12:

**Tabla 12**

*Condiciones para RFLP*

REACTIVO	CANTIDAD (μL)
<b>DNA AMPLIFICADO</b>	15
<i>Cfo I o Hha I</i>	0.4
<b>BUFFER</b>	2.5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7.1

- ii) Los tubos se colocaron en el termociclador (*Labnet™ Termociclador MultiGene™ OptiMax*) a una temperatura de 37°C por 3 horas.
- iii) Los genotipos se observaron e identificaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 8.0%, de acuerdo con la tabla 13, tomando como referencia la Figura 13. Se colocaron 25μl de muestra con 7μl de colorante de carga y 7μl del colorante GELRED 1X a 290V durante 5 horas en buffer TBE 1X (Tris-EDTA-Ácido bórico)

**Tabla 13**

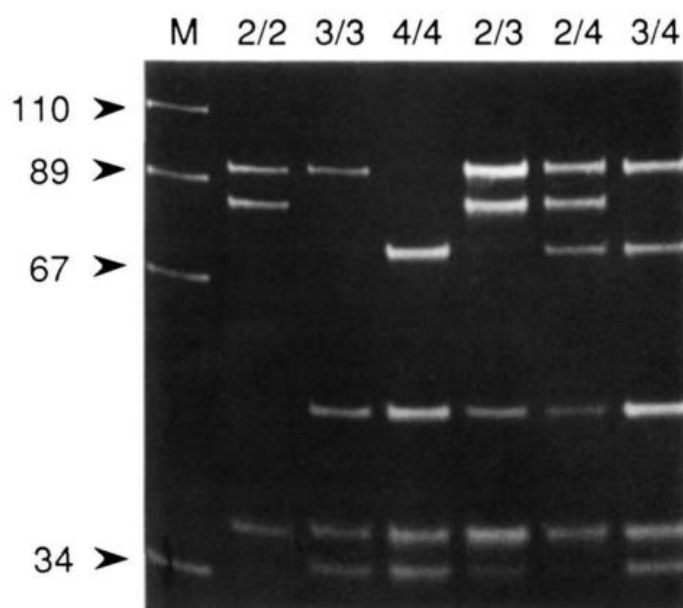
*Fragmentos relacionados con los genotipos del gen APOE*

GENOTIPO	BANDAS PRESENTES (bp)
<b>E2/E2</b>	91, 83
<b>E3/E3</b>	91, 48, 35
<b>E4/E4</b>	72, 48, 35, 19
<b>E2/E3</b>	91, 83, 48, 35
<b>E2/E4</b>	91, 83, 72, 48, 35
<b>E3/E4</b>	91, 48, 35, 19

(Hixson, J. y Vernier, D., 1990)

### Figura 13

Separación electroforética de fragmentos *HhaI*



En la parte superior, se muestra un gel de poliacrilamida tras la electroforesis de fragmentos *HhaI* de un homocigoto E2/E2 (carril marcado con 2/2), homocigoto E3/E3 (3/3), homocigoto E4/E4 (4/4), heterocigoto E2/E3 (2/3), heterocigoto E2/E4 (2/4) y heterocigoto E3/E4 (3/4). Los tamaños de los fragmentos de un estándar de ADN (en pb) (pUC18 digerido por *MspI*, carril marcado como M) se muestran a la izquierda del gel. Fuente: Hixson, J. y Vernier D., 1990.

#### 5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS v22. Se compararon las frecuencias de los casos de NMO y NMOSD contra los controles sanos, los casos de EM (EMRR y EMSP) y los demás casos de ED; se determinó la asociación de los genotipos y alelos de APOE con la enfermedad mediante chi cuadrada de Pearson o Fisher en los casos donde el número de sujetos fue menor a 5, al 95% de confianza, interpretando diferencia significativa cuando los valores de p fueron menores a 0.05

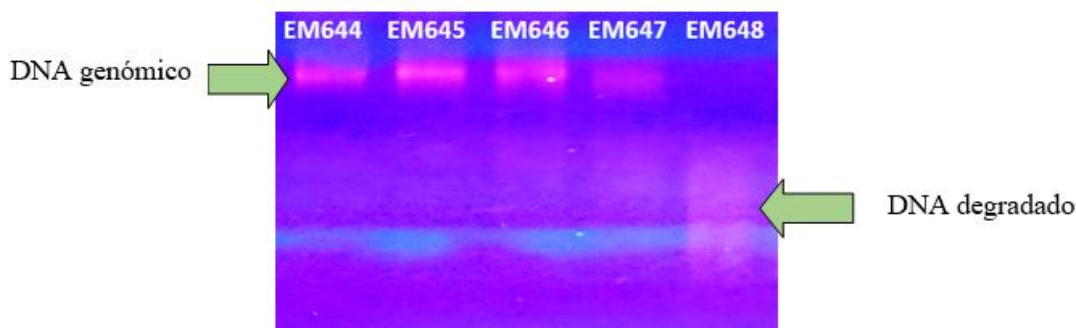
## VII. RESULTADOS

### ➤ Análisis de las muestras de DNA

Se identificaron un total de 264 muestras de DNA genómico del banco de DNA del INNyN, dichas muestras presentan diagnóstico de alguna enfermedad desmielinizante. Las muestras se cuantificaron y se evaluó la integridad mediante electroforesis en geles de agarosa (*Figura 14*). Para la técnica de PCR de punto final, se eligieron las muestras con valores de pureza óptimos, se ajustaron los valores de concentración de acuerdo con la tabla 10 y la integridad fue un criterio de importancia debido a que la mayoría de las muestras se encuentran con un importante grado de degradación, se verificó la amplificación de fragmentos de PCR por medio de electroforesis en geles de agarosa (*Figura 15*). Por último, los amplicones se sometieron a la técnica RFLP, para posteriormente identificar los genotipos por medio de electroforesis en geles de acrilamida al 8% (*Figura 16*).

**Figura 14**

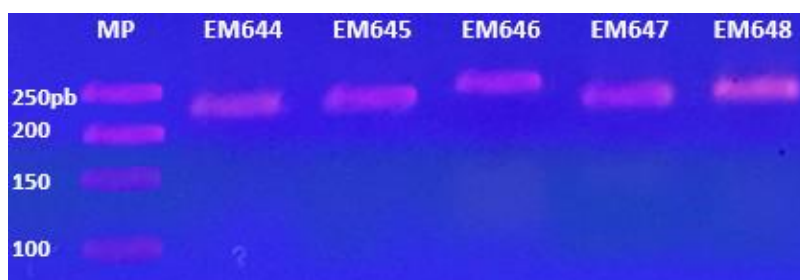
*Integridad de muestras de DNA genómico*



En la parte superior del pozo se indica el registro de la muestra. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, tinción con Gel Red y colorante de carga, 100V, 30 minutos, 2 $\mu$ L de DNA genómico. Se observa que las muestras EM644, EM645 y EM646 presentan buena integridad, mientras que EM647 cuenta con poca degradación en comparación con la muestra EM648 la cual se encuentra degradada.

**Figura 15**

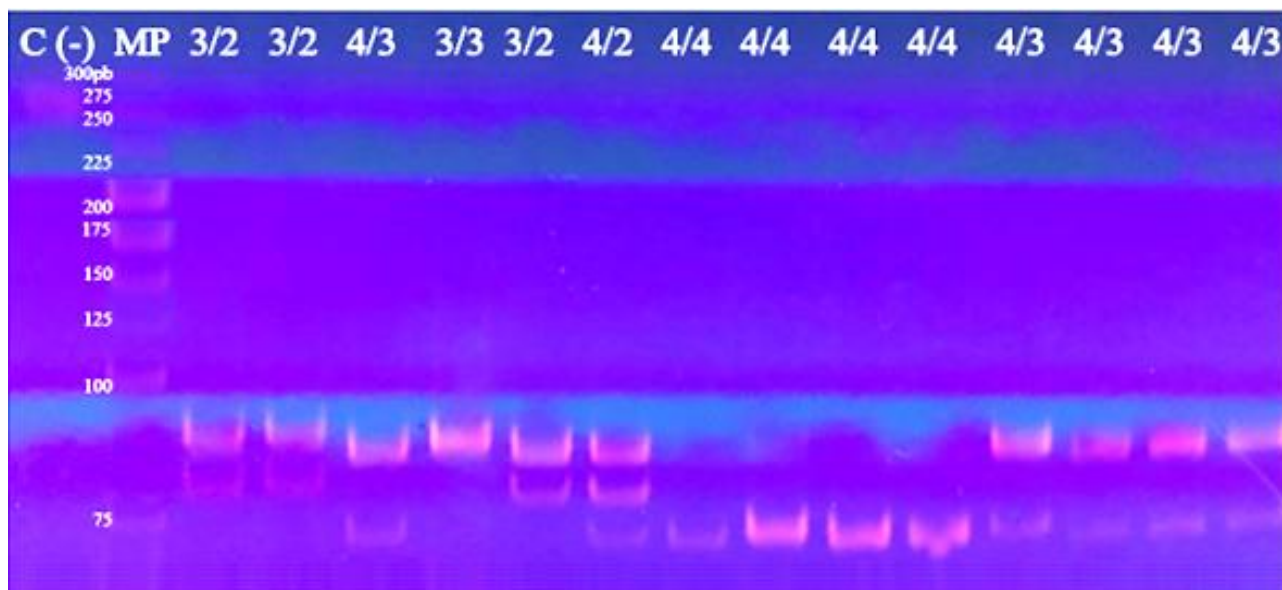
*Amplificación de fragmentos de DNA genómico por medio de la técnica de PCR de punto final*



En la parte superior del pozo se indican las siglas de identificación de las muestras. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, tinción con Gel Red y colorante de carga, 100V, 20 minutos, 2µL de DNA amplificado. En el pozo 1 identificado como MP: Marcador de peso molecular *Invitrogen™ 50 bp DNA Ladder*, mientras que las muestras EM644 a la EM648 presentaron una banda correspondiente al producto amplificado de 244 pb.

**Figura 16**

*Genotipificación del gen APOE por medio de la técnica RFLP empleando las enzimas Cfol o HhaI*



En la parte superior del pozo se indican las siglas de identificación de las muestras. Electroforesis en gel de acrilamida al 8.0%, tinción con Gel Red y colorante de carga, 290V, 5 horas, 18 µL de DNA amplificado. En el pozo inicial, se identifica a la primera muestra como C(-) tratándose del control negativo que es el fragmento de PCR previamente amplificado. MP: Marcador de peso molecular *Invitrogen™ 25 bp DNA Ladder*. Pozos identificados como 3/2: Bandas de 91bp y 83pb. 4/3: Bandas de 91bp y 72 bp. 3/3: Bandas de 91 bp. 4/2: Bandas de 91 bp, 83 bp, 72 bp. 4/4: Bandas de 72 bp. Para la identificación de los genotipos, se tomaron como referencia las siguientes bandas: 91bp (E3), 72bp (E4) y 83 bp (E2)



El grupo control se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg. Las frecuencias de los genotipos y de los alelos fueron analizadas encontrando valores estadísticamente significativos reportados en la *Tabla 14*. Existen frecuencias similares del genotipo 3/3 en población control, en los grupos de Esclerosis múltiple (EM, EMRR y EMSP) y en el grupo de Enfermedades Desmielinizantes (ED), mientras que en los grupos de Neuromielitis óptica (NMO y NMO total) se observan frecuencias mayores del genotipo 3/3 (> 80%). En cambio, la frecuencia del genotipo 4/3 es prácticamente la misma entre controles y los casos de NMO (14%), mientras que se eleva a más del 20% en los casos y subtipos de EM, así como ED. El genotipo 3/2 es poco frecuente en casos de NMO, pero comparte frecuencias entre los casos de EM, ED y controles.

Las frecuencias alélicas revelan que el alelo  $\epsilon 3$  es más frecuente entre casos de NMO, el alelo  $\epsilon 4$  en casos de EM y el alelo  $\epsilon 2$  tiene su mayor frecuencia en el grupo control.

**Tabla 14**

*Genotipos de APOE y frecuencias alélicas en pacientes con enfermedades desmielinizantes y controles*

<b>APOE genotipo /alelo</b>	<b>NMO (n=81)</b>	<b>NMOSD (n=40)</b>	<b>EM (n=139)</b>	<b>EMRR (n=104)</b>	<b>EMSP (n=30)</b>	<b>ED (n=182)</b>	<b>Controles (n=229)</b>
<b>3/3, n (%)</b>	69 (85.2)	30 (75.0)	99 (71.2)	75 (72.1)	21 (70.0)	129 (70.1)	179 (78.2)
<b>4/3, n (%)</b>	10 (12.3)	7 (17.5)	31 (22.3)	22 (21.2)	7 (23.3)	41 (22.3)	32 (14.0)
<b>4/4, n (%)</b>	1 (1.2)	1 (0.4)	3 (2.2)	3 (2.9)	0 (0)	5 (2.7)	1 (0.4)
<b>3/2, n (%)</b>	1 (1.2)	2 (5.0)	6 (4.3)	4 (3.8)	2 (6.7)	9 (4.9)	15 (6.6)
<b>4/2, n (%)</b>	0 (0)	0 (0.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0.9)
<b>2/2, n (%)</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b><math>\epsilon 3</math>, n (%)</b>	80 (86.9)	39 (79.6)	136 (77.3)	101 (77.7)	30 (100)	179 (76.5)	226 (81.3)
<b><math>\epsilon 4</math>, n (%)</b>	11 (11.9)	8 (16.3)	34 (19.3)	25 (10.2)	0 (0)	46 (19.7)	35 (12.6)
<b><math>\epsilon 2</math>, n (%)</b>	1 (1.2)	2 (4.1)	6 (3.4)	4 (3.1)	0 (0)	9 (3.8)	17 (6.1)

*NMO, Neuromielitis óptica; NMOSD, Espectro de Neuromielitis óptica; EM, Esclerosis Múltiple; EMRR, Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente; EMSP, Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva*

En la *Tabla 15* se encuentra el análisis de asociación de los genotipos APOE con la NMO. En primer lugar, el alelo  $\epsilon 2$  es significativamente más frecuente en el grupo control (7.4%) que en el grupo de pacientes ED (2.7%; OR= 0.34, IC95%= 0.15-0.76, p= 0.006) actuando como factor protector contra la enfermedad desmielinizante.

El modelo de cohorte entre pacientes con NMO y los demás pacientes con alguna otra enfermedad desmielinizante (ED) indica que existe mayor frecuencia del genotipo 3/3 en el grupo de casos de NMO (85.2%) que en el resto de los pacientes con ED (p= 0.009) influenciada por el sexo femenino [NMO (60 casos, 85.7%) vs. ED (82 casos, 71.3%) OR= 2.41, IC95%= 1.10-5.28, p= 0.024]. Por otro lado, el alelo  $\epsilon 4$  de APOE resultó ser más frecuente en el grupo de ED que en el grupo de NMO (13.6%; OR= 0.47, p= 0.037).

Al comparar los casos NMO contra los casos de EM, se observan frecuencias similares a las anteriores, el genotipo 3/3 es más frecuente en el grupo de NMO (85.4%) mientras que el alelo  $\epsilon 4$  fue más frecuente en el grupo de EM (24.5%) (OR= 0.48, p=0.049). Sucede lo mismo en el caso de NMO (85.4%) comparado contra el subtipo EMRR (72.1%) el genotipo 3/3 es estadísticamente más frecuente en el grupo de NMO (OR=2.26, IC95%=1.07-4.76, p=0.030).

Si al grupo de NMO se le agregan los casos de mielitis longitudinal (ML) y neuritis óptica inflamatoria recurrente crónica (CRION), y se comparan contra los demás casos de ED o EM, también se observan diferencias estadísticas (p= 0.048 y 0.042, respectivamente). Desafortunadamente no se cuenta con el dato del seroestado AQP4 en todos los pacientes de NMO y NMOSD, sin embargo, el 100% de los casos de NMO con prueba positiva para IgG-AQP4 fueron portadores del alelo  $\epsilon 3$ , donde hubo 28 casos femeninos y 4 masculinos, estos últimos portadores del alelo  $\epsilon 4$ .

Se analizó la edad de inicio entre los casos de NMO y los casos de EMRR portadores de APOE 3/3 y 4/3; los casos de NMO (43 casos) portadores del genotipo 3/3 tuvieron edad de inicio promedio 10 años mayor que los casos de EMRR (19 casos) (38.8±10.5 años vs. 27.9±8.6 años; t= 3.962, gl= 60, p= 0.0001). Sin embargo, no encontramos diferencia significativa entre los portadores del genotipo 4/3 con NMO (8 casos, 38.1±9.9 años) y EMRR (4 casos, 27.5±7.8 años), p> 0.05.

**Tabla 15**

*Asociación genotípica y alélica de APOE en población mestiza mexicana*

Genotipos/ Alelos APOE	Sexo	Seroestado	Frecuencia n (%)	OR	IC 95%	p
3/3		NMO	69 (85.2%)	2.45	1.23-4.88	0.009*
		ED	129 (70.1%)			
	F	NMO	60 (85.7%)	2.41	1.10-5.27	0.024*
		ED	82 (71.3%)			
	M	NMO	9 (81.8%)	2.11	0.41-10.58	0.490
		ED	47 (68.1%)			
		NMOSD	85 (82.5%)	1.83	1.00-3.35	0.048**
		ED	129 (72.1%)			
	F	NMOSD	71 (84.5%)	2.04	0.99-4.19	0.05**
		ED	83 (72.8%)			
	M	NMOSD	14 (73.7%)	1.16	0.36-3.66	0.805
		ED	46 (70.8%)			
		NMOSD	85 (82.5%)	1.91	1.02-3.57	0.042*
		EM	99 (71.2%)			
		NMO	70 (85.4%)	2.36	1.15-4.81	0.017*
		EM	99 (71.2%)			
		NMO	70 (85.4%)	2.26	1.07-4.76	0.030*
		EMRR	75 (72.1%)			
AQP4 (+)	NMO	32 (100%)				
	Control	226 (98.7%)				
AQP4 (+)	NMO	32 (100%)				
AQP4 (-)	NMOSD	13 (92.9%)				
ε2		ED	10 (2.7%)	0.34	0.15-0.76	0.006*
		Control	17 (7.4%)			
ε4		NMO	11 (13.6%)	0.47	0.23-0.97	0.037*
		ED	46 (25.0%)			
		NMO	11 (13.4%)			
		EM	34 (24.5%)			

\*Estadísticamente significativo. \*\*Tendencia a valores significativos. NMO, Neuromielitis óptica; NMOSD, Espectro de Neuromielitis óptica; ED, Enfermedad desmielinizante; EM, Esclerosis Múltiple; AQP4 (+), Anticuerpos anti-acuaporina4 positivo; AQP4, Anticuerpos anti-acuaporina 4 negativo; OR, Odds ratio; IC, Intervalo de confianza; n, número de individuos.

## VIII. DISCUSIÓN

La importancia de las apolipoproteínas en el SNC surgió con la asociación del alelo  $\epsilon 4$  de la ApoE con la enfermedad de Alzheimer (EA). Estudios posteriores han demostrado que la ApoE y ApoJ están relacionadas con la formación de las placas seniles y los depósitos amiloides de los vasos sanguíneos. ApoE está relacionada con el transporte, almacenamiento y redistribución de los lípidos cerebrales (Del Valle, *et al.*, 2007). La ApoE se sintetiza a nivel de SNC y participa en el transporte de lípidos, así como en la remielinización de oligodendrocitos, resulta de interés en las enfermedades de tipo desmielinizante.

En este estudio se examinaron los alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$  del gen APOE en 264 pacientes con diagnóstico de enfermedad desmielinizante, en donde 82 pacientes presentan NMO, y 229 controles.

La isoforma APOE4 reduce la estabilidad de la proteína y se encuentra asociada con el desarrollo de varias patologías, entre ellas el Alzheimer (EA), las enfermedades coronarias y cerebrovasculares, la depresión de aparición tardía, el trastorno bipolar y la esquizofrenia; en cambio la isoforma APOE2 que tiene cisteína tanto en los sitios 112 como 158 es considerada un factor protector para la EA (Rubio, C., Gutiérrez, L. y Pedraza, O., 2021). Los resultados de este estudio sugieren que APOE2 también protege contra la enfermedad desmielinizante.

La relación entre el gen APOE y las enfermedades desmielinizantes aún no es un campo de estudio muy desarrollado. Se tienen reportados varios estudios entre la relación del gen APOE con la esclerosis múltiple, pero dichos estudios son contradictorios. En estudios previos, se reporta que el alelo  $\epsilon 4$  está asociado a mayor riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Masterman, T. *et al.*, 2002) mientras que otros autores reportan la no asociación del alelo  $\epsilon 4$  con la EM (Xuan, C. *et al.*, 2011). En un reciente estudio, Momkute, L. y *cols.* (2022), reportaron que el genotipo 3/3 puede aumentar el riesgo de padecer neuritis óptica en hombres, mientras que el genotipo 3/4 puede reducir el riesgo en el mismo género para el desarrollo de la enfermedad en población caucásica, por lo que se puede no asociar al alelo  $\epsilon 4$  como factor de riesgo en este tipo de enfermedades desmielinizantes,

pero ya se vislumbra que el genotipo 3/3 ejerce algún efecto que desencadena la neuritis óptica (NO), como en este estudio, donde todos los casos de NMO mestizo mexicanos analizados presentaron NO entre sus síntomas y los portadores del genotipo 3/3 tuvieron 2.4 veces más riesgo de ser portador de NO que los portadores que presentan otro genotipo, donde el 85% fueron mujeres. Por otro lado, se tiene reportado que el alelo  $\epsilon 4$  en estado homocigoto está asociado con un bajo rendimiento cognitivo en pacientes con SCA (Síndrome Clínicamente Asilado) y EMRR (Esclerosis Múltiple Recurrente Remitente) (Engel, S., *et al.*, 2020); en cambio, en este estudio de población mexicana encontramos que el alelo  $\epsilon 4$  fue más frecuente en el grupo de EM en comparación con el de NMO ( $p > 0.05$ ).

Se ha reportado que existen diferentes características clínicas entre los casos de NMO y los casos de NMOSD seronegativos respecto a los pacientes seropositivos para AQP4, implicando mecanismos neuropatológicos distintos, por lo que el tratamiento y el pronóstico a largo plazo debería ser distinto entre ambas entidades (Luna, E. *et al.*, 2017). En un centro de referencia mexicano compararon los espectros clínicos de Neuromielitis óptica según el seroestado del anticuerpo AQP4, reportando que existe mayor discapacidad en los casos seropositivos para AQP4 respecto a los seronegativos en los que se observó mayor recuperación medular ( $p < 0.05$ ). En nuestro estudio no fue posible contar con todos los resultados del seroestado AQP4, pues la realización del estudio depende del criterio clínico, el criterio diagnóstico, la sintomatología del individuo, la disponibilidad de la prueba en el laboratorio, así como el tiempo transcurrido entre consultas, sin embargo, cabe resaltar que el 100% de los casos de NMO captados como seropositivos para IgG-AQP4 fueron portadores de APOE  $\epsilon 3$  con el 87.5% pertenecientes al sexo femenino. De nuevo, la incidencia fue más elevada en mujeres que en hombres en todos los grupos de edad, concluyendo que los anti-AQP4 son más prevalentes en mujeres que en hombres, así mismo Luna y *col.* 2017 afirman que el sexo femenino es el mayormente afectado tanto en los seropositivos como en los seronegativos.

En el 2000, Yaffe. K y *cols.* reportaron el uso de estrógenos y la relación entre APOE y el deterioro cognitivo, encontrando que las mujeres que presentan el alelo  $\epsilon 4$  tenían un índice de riesgo mayor de deterioro cognitivo ([HR] = 1,47; IC del 95%: 1,13 - 1,90), mientras que el uso de estrógenos en mujeres que presentan el alelo  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 2$ , redujo el riesgo de deterioro cognitivo mientras que no redujo el riesgo entre las mujeres que presentan  $\epsilon 4$  (uso actual,

HR = 1,33; IC del 95 %, 0,74 a 2,42). El uso de estrógeno se asoció con menos engrosamiento de la pared carotídea interna y común en mujeres con ε2 y ε3, pero no con mujeres con ε4 (p < 0.05); por lo que estos resultados podrían ser la base para que se realicen más estudios entre la relación de APOE y las enfermedades neurodegenerativas, debido a que el sexo femenino es el que prevalece en este estudio, así como la presencia del alelo ε3 (principalmente del genotipo 3/3 y los heterocigotos 3/2 y 3/4) y de estudios como el de Luna y cols. (2017).

La edad de inicio encontrada en este estudio también es consistente con la reportada en el estudio de Sepúlveda y cols. (2022), en donde reporta una edad de inicio en mujeres con NMO entre los 40 y los 59 años, mientras que, en nuestro estudio, la edad de inicio comprende entre 38.8±10.5 años sin diferencia de sexo (Tabla 16).

**Tabla 16**

*Comparación entre NMO y EM*

CARACTERÍSTICAS	NMO	EM
GENOTIPO/ALELO APOE	3/3	ε4
SEXO	F	Sin diferencia
EDAD DE INICIO	38.8±10.5	27.9±8.6
SEROESTADO	AQP4 (+)	BOC (+)*
INCIDENCIA*	1 por 100,000	11 a 20 por 100,000

\*Dato tomado de Fernández, C., 2018. \*\*Incidencia recuperada de Sepúlveda y cols.,2022

Williams y cols. 2022, reportan que las partículas de lipoproteínas ApoE astrocíticas y plasmáticas son estructuralmente diferentes y se cree que las primeras carecen del núcleo de éster de colesterilo. Por lo tanto, es posible que la relación estructura-función de los grupos de ApoE periféricos y del SNC sean distintas, lo que sugiere que estos dos grupos de ApoE pueden actuar de forma independiente como factores de riesgo para desarrollar patologías en el SNC como demencias neurodegenerativas o metabólicas como aterosclerosis a nivel periférico. Este estudio podría ser un claro ejemplo en el que dos entidades aparentemente similares por ser enfermedades desmielinizantes, como son la EM y la NMO, posean distinta afinidad por las partículas portadoras de APOE, donde la ApoE 3/3, considerada como la forma normal y más frecuente entre poblaciones, está

involucrada en el mecanismo etiológico de la NMO, mientras que la ApoE 4/3 se encuentra relacionada al mecanismo que conduce a la EM.

Como la mayoría de las proteínas, ApoE sufre modificaciones postraduccionales; ApoE mediante la O-glicosilación en diferentes sitios y en mayor grado en el líquido cefalorraquídeo (LCR) que en el plasma. Además, está reportado que la escisión C-terminal de la ApoE del SNC ocurre de manera dependiente de la isoforma y el tipo de célula, y podría exacerbar los efectos de la inflamación y los déficits de comportamiento en ratones. En las neuronas, ApoE3 y ApoE4 tienen diferentes perfiles de tráfico intracelular: ApoE4 es retenido en el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, y se mueve más lentamente a través de las vías secretoras. En los astrocitos, la ApoE4 causa estrés en el RE. La diferencia de aminoácidos de ApoE4 respecto a ApoE3, promueve un mal plegamiento entre Arg-61 en el dominio N-terminal y el residuo Glu-255 en el dominio C-terminal. ApoE4 en astrocitos mostró una mayor degradación y una vida media reducida en comparación con ApoE3. Estas observaciones llevaron a la hipótesis de que las proteínas mal plegadas se acumulan en el ER y en el aparato de Golgi, provocando una activación de las vías de procesamiento proteolítico y una disminución en la abundancia de ApoE (Lanfranco, M. *et al.*, 2021), por lo que con los resultados obtenidos podemos especular y plantear un posible mecanismo de desmielinización asociado a ApoE (*Figura 16*), en donde ApoE3 presenta menor degradación en comparación con ApoE4 la cual es mayormente degradada por su mal plegamiento y de acuerdo con Williams y cols. 2022, la ApoE sintetizada por los astrocitos puede carecer del núcleo de colesterol, favoreciendo a que ApoE3 se una a las lipoproteínas provocando la formación de IgG-AQP4 permitiendo la activación del complemento en los astrocitos lo que conlleva al proceso inflamatorio promoviendo así la desmielinización en la enfermedad.

Krasemann, S. y cols. (2017) proponen que la activación de la vía TREM2-APOE tiene como consecuencia la pérdida de la capacidad de la microglía (MGnD) para prevenir la pérdida neuronal y proporcionar señales tolerogénicas a las células T. En el contexto de la Esclerosis múltiple (EM), esto amplificaría las propiedades proinflamatorias de las células T, esto también lo reporta Ahmed, S. y col. (2022), en donde retoma que ApoE induce el fenotipo neurodegenerativo microglial (MGnD) que tiene funciones proinflamatorias y fagocíticas en enfermedades degenerativas, además de que la función fagocítica está mediada por la interacción de ApoE con TREM2 presente en la microglía. La ausencia de

ApoE disminuye la capacidad de la microglía para degenerar neuronas por un mecanismo inflamatorio y fagocítico que puede contribuir a la neuro protección en la deficiencia de ApoE.

Con los estudios anteriores, podemos sugerir que ApoE3 que podría carecer de núcleo esterificado, según Williams y cols. (2022), puede ser el que favorezca el proceso inflamatorio por medio del fenotipo neurodegenerativo microglial (MGnD) y de la activación del complemento, por lo que, no sólo interviene la estructura de ApoE sino también su interacción con otras proteínas lo que abre un campo de estudio muy amplio.

Esta activación del complemento provocada por IgG-AQP4 ha sido estudiada por Hinson, S. y cols. (2008), en el que demostraron que los pacientes con NMO y la activación del complemento comprometen la integridad de la membrana de los astrocitos, en donde la AQP4 sufre endocitosis con pérdida concomitante de EAAT2 (Transportador de aminoácidos excitadores 2), por lo que sus datos sugieren que EAAT2 y AQP4 existen en membranas astrocíticas como un complejo macromolecular. Por lo tanto, la unión de IgG-AQP4 astrocítica inicia varios procesos potencialmente neuro-patógenos, como la activación del complemento, regulación a la baja de AQP4 y EAAT2, esto podría explicar la lesión que sufren los oligodendrocitos en la médula espinal y en el nervio óptico, ya que son estructuralmente dependientes de la homeostasis del glutamato (Arias, N. y Valencia D., 2014). La unión específica de IgG a AQP4 en los astrocitos bloquea las funciones de las proteínas y reduce la actividad de EAAT2. Una vez comprometida, EAAT2 no puede absorber glutamato libre del espacio extracelular, lo que desencadena excitotoxicidad en las células, que se caracteriza por la sobre activación de los receptores de glutamato en las neuronas postsinápticas. Por lo tanto, las lesiones de mielitis y neuritis óptica longitudinalmente extensas observadas en pacientes con NMOSD pueden ser el resultado del daño astrocítico primario desencadenado por la unión de IgG a AQP4, que puede activar la cascada del sistema inmunitario y, además, regular a la baja EAAT2.

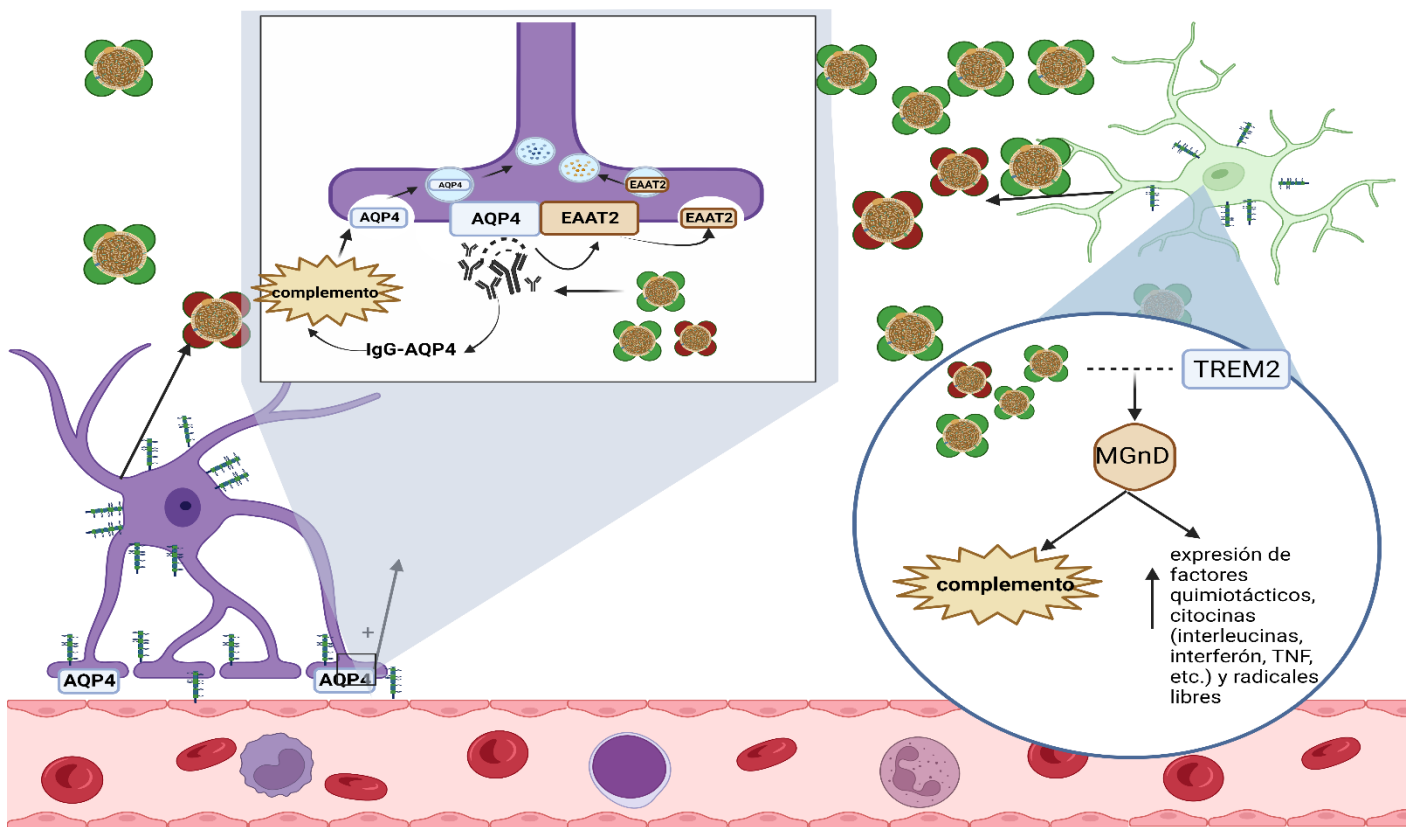
Todos estos procesos pueden explicar las lesiones destructivas en el NMOSD secundarias a la neuroinflamación y la excitotoxicidad glutamatérgica (Bornes da Silva, A. *et al.*, 2019). La toxicidad del glutamato se postula comúnmente como un mecanismo que media la progresión de los procesos neurodegenerativos. La concentración extracelular de glutamato en el SNC está elevada en muchas enfermedades neurodegenerativas. Sin



embargo, los oligodendrocitos son muy sensibles a las señales excitotóxicas mediadas por el glutamato permeable al calcio. Es posible que la toxicidad del glutamato pueda contribuir a la desmielinización a través de un efecto sobre los oligodendrocitos (Hinson, S. *et al.*, 2008).

**Figura 17**

*Proceso de desmielinización asociado con APOE*



Los astrocitos sintetizan ApoE (que podría carecer del núcleo de colesterol, principalmente ApoE3), favoreciendo su unión a las lipoproteínas provocando la formación de IgG-AQP4 que permite la activación del complemento, en donde AQP4 sufre un proceso de endocitosis, al mismo tiempo que EAAT2; A su vez, la microglía sintetiza ApoE que interactúa con TREM2, esta interacción favorece el proceso inflamatorio por medio de MGnD y de la activación del complemento promoviendo el proceso de desmielinización en la NMO. *Fuente: Mondragon Marín Nancy, Elaboración propia.*

Ahmed., S. y cols. (2022), diseñaron diferentes péptidos miméticos de ApoE que demuestran la variabilidad funcional de ApoE, abriendo la posibilidad de que las diferentes variantes presentes (aparte de las ya reportadas de residuos de Cys y Arg en posiciones 112 y 158), sino todas las variantes presentes en los dominios RBD y LBD, así como la región entre dominios, en la secuencia de ApoE tengan impacto para realizar sus funciones e interactuar con otras proteínas sino que también estén participando en la generación de diferentes haplotipos con la consecuente generación de diferentes fenotipos clínicos dentro de una misma entidad llamada Neuromielitis óptica, por lo que podría ser de utilidad conocer la secuencia de nucleótidos de APOE en los pacientes con NMO y establecer una correlación genotipo-fenotipo.

## IX. CONCLUSIÓN

Contrario a lo que se esperaba, el genotipo APOE 3/3 está asociado como factor de riesgo para Neuromielitis óptica, principalmente en mujeres, mientras que el alelo  $\epsilon$ 4 de APOE es más frecuente en casos de esclerosis múltiple.

El alelo APOE  $\epsilon$ 2 está asociado como factor protector contra NMO.

La edad de inicio está asociada al genotipo 3/3 de APOE donde los casos EMRR inician la enfermedad 10 años antes que los casos de NMO, pero el alelo  $\epsilon$ 4 no influye sobre la edad de inicio.

El 100% de los casos de NMO portadores del alelo  $\epsilon$ 3 de APOE fueron positivos para la prueba IgG-AQP4.

## X. PERSPECTIVAS

- ✓ Determinar si la ApoE sintetizada a nivel del SNC y periférico son estructuralmente diferentes, por lo que pueden actuar de forma independiente como factores de riesgo para el desarrollo de patologías neurodegenerativas a nivel del SNC o metabólicas a nivel periférico.
- ✓ Realizar la secuenciación de APOE en pacientes con NMO para identificar las distintas variantes presentes y establecer una correlación genotipo-fenotipo.

## ANEXOS

### 1. Metodología para la extracción de DNA a partir de sangre periférica

Técnica de Covarrubias modificado de Buffone y Darlington; Millar y Polesy; Maniatis y Fritsch.

- i) Transferir 3 mL de sangre a un tubo cónico de 15 mL y agregar tres veces el volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10mM, Tritón 1%, Sacarosa 0.32M). Invertir el tubo varias veces.
- ii) Centrifugar la muestra a 5000 rpm durante 10 minutos y decantar cuidadosamente el sobrenadante.
- iii) Agregar al botón 1 mL de amortiguador TTS. Re suspender el botón y pasar a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Agitar hasta homogenizar.
- iv) Centrifugar a 13500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante y añadir 1 mL de amortiguador TTS, re suspender.
- v) Centrifugar a 13500 rpm durante 6 minutos a 4°C (repetir de dos a tres veces el paso anterior)
- vi) Al botón limpio, agregar 570 µL de NaCl 5mM. Agitar durante 2 minutos y colocar 30 µL de SDS al 10%. Agitar durante 5 minutos y agregar 200 µL de NaCl saturado. Agotar durante 10 minutos.
- vii) Centrifugar a 13500 durante 15 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL y agregar 600 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1), mezclar suavemente por inversión durante 10 minutos, centrifugar a 13500 rpm a 4°C durante 15 minutos.
- viii) Tomar la fase superior y pasarla a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Agregar el doble del volumen de etanol absoluto frío para precipitar el DNA con agitación suave.
- ix) Centrifugar a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C y decantar sin perder el botón.
- x) Agregar 500 µL de etanol al 70% frío, re suspender el botón y centrifugar a 11000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Decantar (Repetir este paso una vez más).
- xi) Secar el botón de DNA y re suspender en un máximo de 200 µL de agua estéril a 37°C, incubar a 50°C una hora

## 2. Criterios de la evaluación de la integridad.

La integridad se evaluó por medio de un sistema cualitativo arbitrario de cruces:

- 1+: ADN degradado o banda poco visible
- 2+: Fragmento de ADN visible con degradación
- 3+: Fragmento de ADN visible, integra con poca degradación
- 4+: Fragmento de ADN visible e integro

## 3. Condiciones adecuadas para la realización de PCR

Para realizar la PCR del gen APOE, se consideraron las muestras que presentan un valor de pureza de 1.6 a 2.0, con las siguientes condiciones de reacción:

- 40 ciclos
- **ADN genómico [200-300 ng/μl]**
- Oligonucleótidos F4 y F6 [100 ng/μl]
- DMSO (5%)
- MasterMix (50%)
- c.b.p. H<sub>2</sub>O 20μl

CONCENTRACIÓN (ng/ μl) *	INTEGRIDAD**	ADN
200- 300	4+	1.0 μl
200- 300	3+	1.0 μl
200- 300	2+	1.5-2.0 μl
200- 300	1+	2.0-3.0 μl
<200	3+- 4+	cpb 200- 300 ng/ μl
<200	2+	cbp 200-300 ng/ μL + 2.0 μl
<200	1+	cbp 200-300 ng/ μL + 4.0 μl

\*Concentración:

La concentración adecuada para realizar la PCR es de 200 a 300 ng/μl, por lo que las muestras dentro de este rango se les agrega 1 μl de las mismas para la reacción. Estos valores se pueden modificar dependiendo de la integridad de las muestras.

Por ejemplo:

- 🚦 Si la concentración es <200 ng/μl se puede incrementar la cantidad de la muestra para poder obtener la adecuada.

Ej1. Concentración muestra: 25 ng/ μl x 10= 250 ng/ μl **ADECUADA**

Por lo que en lugar de agregar 1 μl de la muestra se agregan 10 μl de la misma para poder obtener la concentración ideal para la PCR.

Ej2. Concentración muestra: 74 ng/ μl x 3= 222 ng/ μl **ADECUADA**

Por lo que en lugar de agregar 1  $\mu\text{l}$  de la muestra se agregan 3  $\mu\text{l}$  de la misma para poder obtener la concentración ideal para la PCR

- ✚ Si la concentración es  $>300 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , se procede a realizar una dilución para obtener la concentración ideal.

#### \*\*Integridad

La integridad, se evaluó por medio de un sistema cualitativo arbitrario de cruces explicados anteriormente en el *apartado 2*.

- ✚ Si la integridad es  $<2+$  se aumenta la cantidad de muestra, aunque la concentración sea la ideal para asegurar que la reacción se lleve a cabo.

## Bibliografía

1. Ahmed, S., Pande, A., Sharma, S. (2022). *Therapeutic potential of ApoE-mimetic peptides in CNS disorders: Current perspective*. Experimental Neurology; 353. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114051>
2. Alonso, R., Rey, R., Garcea, O. (2014). *Encefalomiелitis aguda diseminada en adultos: presentación de una serie de casos en Argentina*. Neurol Arg; 6(2): 83-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuarg.2014.02.001>
3. Arias, G, NP., Valencia, D. (2014). *Neuromielitis óptica, anticuerpos anti-acuaporina 4*. Rev Med MD; 6(1): 58-61. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2014/md141k.pdf>
4. Blanco, Y., Hankiewicz, S., Llufríu, L. et al. (2010). *Espectro clínico asociado a anticuerpos contra acuaporina 4 (IgG-NMO)*. Neurología; 25(1): 5-12. doi: [https://doi.org/10.1016/S0213-4853\(10\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S0213-4853(10)70016-5)
5. Bermejo, P., Blasco, M., Sánchez, A. et al. (2011). *Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. Concepto, clasificación y epidemiología*. Medicine; 9 (76): 4859-4866. [https://doi.org/10.1016/S0211-3449\(07\)75462-0](https://doi.org/10.1016/S0211-3449(07)75462-0)
6. Bernhardt von Rommy. (2004). *The Blood-Brain Barrier and the pathology of the Central Nervous System: It's importance for the inflammatory response*. Rev. Chil. Neuro-Psiquiat; 42(2): 121-130. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92270004000200005>
7. Bornes da Silva, A., Guerini, D., Onofre, D. et al. (2019). *Role of Glutamatergic Excitotoxicity in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders*. Front Cell Neurosci; 13:142. doi: 10.3389/fncel.2019.00142
8. Brandan, N., Llanos, C. et al. (2006). *Lipoproteínas*. Universidad Nacional del Nordeste. <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/lipoproteinas.pdf>
9. Carnero, E., Hryb, J., Leguizamón, F. et al. (2017). *Diagnósticos diferenciales y pronóstico de las mielitis longitudinales extensas en Buenos Aires, Argentina*. Rev Neurol; 32(2): 99-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2015.06.013>
10. Cortés, A., Pacheco, P. (2013). *Flujo sanguíneo y actividad celular del sistema nervioso: relación estructura-función*. Rev Mex Neuroci; 14(1): 31-38. [medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2013/rmn131g.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2013/rmn131g.pdf)
11. Del Valle, E., Navarro, A., Astudillo, A. et al. (2007). *La apolipoproteína D en la angiopatía cerebral amiloidea*. III Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. <https://conganat.uninet.edu/IIICVHAP/comunicaciones/057/index.htm>
12. Dorovini-Zis, K. (Ed.). (2015). *The Blood-Brain Barrier in Health and Disease, Volume One: Morphology, Biology, and Immune Function (1st ed.)*. CRC Press. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1201/b18606>



13. Engel, S., Graetz, C., Slamen, A., *et al.* (2020). Is APOE 4 associated with cognitive performance in early MS? *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 7 (4). doi:10.1212/NXI.0000000000000728
14. Errico, T., Chen, X., Martín, J. *et al.* (2013). *Mecanismos básicos: estructura, función, y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas*. *Clin. Invest. Arterioscl.*25(2); 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003>
15. Fazekas, F., Strasser, S., Schmidt, H. *et al.* (2000). *Apolipoprotein E genotype related differences in brain lesions of multiple sclerosis*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 69:25-28 <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.69.1.25>
16. Fernández, C. (2018). *La Neuromielitis óptica: Revisión bibliográfica*. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/83100/FERN%C3%81NDEZ%20BAOS%2C%20CRISTINA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
17. Fernández, O., Fernández, V., Guerrero, M. (2015). *Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central*. *Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 11(7); 4601-4609. <https://doi.org/10.1016/j.med.2015.04.001>
18. Flores, J. *et al.* (2008). *Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico*. *J. Neurol.* 255(5): 710-5. doi: 10.1007/s00415-008-0781-2.
19. Fontoura, P., Mendes, A., Correia, M. *et al.* (2002). *Leucoencefalitis aguda hemorrágica de Weston Hurst. Estudio neuropatológico de un caso*. *Rev Neurol*; 35(4): 328-331. 10.33588/rn.3504.2000338
20. García, A.M. (2003). *La apolipoproteína E: El polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos, los hábitos alimenticios y el origen étnico*. *Rev. Colombiana de Cardiología*. 10(4). 189-193. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcca/v10n4/10n4a3.pdf>
21. García, O., Massieu, L. (2004). *Interacción entre las células gliales y neuronales y su papel en la muerte y sobrevivencia neuronal*. *Arch Nuerocien*; 9(1): 39-46. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-47052004000100008#:~:text=La%20s%C3%ADntesis%20y%20el%20metabolismo,de%20un%20mecanismo%20denominado%20excitot%C3%B3xico](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-47052004000100008#:~:text=La%20s%C3%ADntesis%20y%20el%20metabolismo,de%20un%20mecanismo%20denominado%20excitot%C3%B3xico).
22. García, P. (2019). *Factores de riesgo genéticos en la enfermedad de Alzheimer esporádico*. Universidad de Sevilla. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/91834/GARC%C3%8DA%20GAMARRO%2C%20PAULA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
23. García, Y., Muñoz, A., Herrera, I. *et al.* (2011). *Apolipoproteína E*. Curso de Formación continuada a distancia. Asociación Española de Biopatología Médica. en: <https://www.aebm.org/formacion%20distancia/distancia%202010-2011/Taller%202010-2011/monografias%202010/7.Alipropoteina%20E.pdf>

24. Gezmis, H., Domac, F., Ormeci, B. *et al.* (2021).  $\epsilon_2$ ,  $\epsilon_3$ , and  $\epsilon_4$  variants of ApoE; rs2228570 (VDR), rs4588 and rs7041 (VDBP) polymorphisms in patients with multiple sclerosis: A case-control study in Turkish population. *International Journal of Clinical Practice*. 75(11). <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1111/ijcp.14801>
25. Guerra, A., Raggio, V., Esperón, P. *et al.* (2013). Polimorfismos de ApoE y daño vascular en diabético tipo 2. *Rev. Méd. Urug*; 29(3). [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1688-03902013000300002](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902013000300002)
26. Guerrero García, J.J. (2020). Participación de los astrocitos en la patogénesis de la Esclerosis Múltiple. *Rev Neurol*; 35(6): 400-408. doi: 10.1016/j.nrl.2017.07.021
27. Guijarro, I. (2013). *Implicaciones funcionales del pericito en la respuesta inmune y en angiogénesis. Identificación de potenciales marcadores predictivos de respuesta a terapias antiangiogénicas.* [Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma de Madrid]. Repositorio UAM. [https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/14241/66617\\_Guijarro%20Muñoz%20Irene.pdf?sequence=1](https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/14241/66617_Guijarro%20Muñoz%20Irene.pdf?sequence=1)
28. Guillamón, T., Gómez, U., Matías, J. (2015). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (i): función y caracterización molecular. *Rev Neurología*; 30(2): 119-129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>
29. Gould, Douglas J. (2014). *Neuroanatomía de bolsillo*. Lippincott W & W.
30. Goodman & Gilman. (2015). *Manual de farmacología y terapéutica (2a. ed)*, McGraw-Hill Interamericana, ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbmhe/detail.action?docID=3225940>.
31. Hatters, D., Peters-Libeu, C., Weisgraber, K. (2006). Apolipoprotein E structure: insights into function. *A Cell Press journal*; 31(8): 445-454. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.06.008>
32. Hervás, J., Pagani, F. (2019). Neuropatía óptica inflamatoria recurrente crónica: revisión de la bibliografía. *Rev. Neurol.*; 68(12): 524-530. <https://doi.org/10.33588/rn.6812.2018261>
33. Hinson, S., Roemer, S., Lucchinetti, C. *et al.* (2008). Aquaporin-4 – binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by downregulating EAAT2. *J. Exp. Med*; 205(11): 2473-2481. [www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20081241](http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20081241)
34. Hixson, J.E., Vernier, D.T. (1990). Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI; Note on Methodology:31(3). 545-548. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)43176-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)43176-1)
35. Kanekiyo, T., Xu, H., Bu, G. (2014). ApoE and A $\beta$  in Alzheimer's Disease: Accidental Encounters or Partners? *Neuron*; 81(4): 740-754. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.045>
36. Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., *et al.* (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*; 47(3): 566-581. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.008.

37. Lalan, S., Khan, M., Schlakman, B. (2012). *Differentiation of Neuromyelitis Optica from Multiple Sclerosis on Spinal Magnetic Resonance Imaging*. *Int J MS Care*; 14(4): 209-214. doi: 10.7224/1537-2073-14.4.209
38. Lanfranco, M., Sepulveda, J., Kopetsky, G. *et al.* (2021). *Expression and secretion of apoE isoforms in astrocytes and microglia during inflammation*. *Glia*; 69: 1478-1493. DOI: 10.1002/glia.23974
39. Loch-Neckel, G., Koepp, J. (2010). *La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central*. *Rev Neurol*; 51(3): 165-174. doi: <https://doi.org/10.33588/rn.5103.2009166>
40. Lopategui, I. Cervantes, M., Pentón, G. (2008). *Neuromielitis ópticas. Principales diferencias con la Esclerosis Múltiple*. *An. Med. Interna*, 25(6). [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212719920080006000010](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212719920080006000010)
41. Luna, E., Acosta, G., Ortiz, J. *et al.* (2017). *Comparación de los espectros de Neuromielitis óptica según el seroestado del anticuerpo AQP4 en un centro de referencia mexicano*. *Rev Neurol*; 65(7): 311-321. doi: 10.33588/rn.6507.2016178
42. Maiese, Kenneth. (2021). *Biología del Sistema Nervioso: Nervios*. Manual MSD: <https://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/enfermedades-cerebrales,-medulares-y-nerviosas/biolog%C3%ADa-del-sistema-nervioso/nervios#:~:text=El%20sistema%20nervioso%20perif%C3%A9rico%20se,por%20haces%20de%20fibras%20nerviosas>.
43. Matamala, D. (2015). *Neuro histología*. Universidad de la Frontera <https://www.med.ufro.cl/neuroanatomia/archivos/pdf/apunte3.pdf>
44. Martínez, A. (2014). *Comunicación entre células gliales y neuronas II. Células gliales que forman la mielina*. *Rev. Med. Inv*; 2(2): 173-188. doi: 10.1016/S2214-3106(15)30003-0
45. Masterman, T., Zhang, Z., Hellgren, D. *et al.* (2002). *APOE genotypes and disease severity in multiple sclerosis*. *Multiple Sclerosis Journal*. 2002;8(2):98-103. doi:10.1191/1352458502ms787oa
46. Medina, R., Sánchez, A., Bertado, B. *et al.* (2018). *Enfermedad de Devic. Reporte de caso y revisión de literatura*. *Rev. Fac. Med. (Mex)*; 61(1). [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S002617422018000100026&lng=es&nrm=sio&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002617422018000100026&lng=es&nrm=sio&tlng=es)
47. Momkute, L., Vilkeviciute, A., Gedvilaite, G. *et al.* (2022). *Association of APOE Serum Levels and APOE  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3, and  $\epsilon$ 4 Alleles with Optic Neuritis*. *Genes*; 13, 1118. <https://doi.org/10.3390/genes13071188>
48. Moreno, A., Cartagena, A., Mora, G. (2006). *Apolipoproteína E y enfermedad Cardiovascular*. *Rev. Fac. Med*; 54(1). [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-00112006000100007](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112006000100007)

49. Muñoz, N., Giraldo, L., Zuluaga, M. *et al.* (2022). *Predictores de discapacidad en una cohorte con espectro de Neuromielitis óptica*. *Rev Neurol*; 74(11): 347-352. doi: <https://doi.org/10.33588/rn.7411.2021498>
50. Nishitsuji, K., Hosono, T., Nakamura, T., *et al.* (2011). *Apolipoprotein E Regulates the Integrity of Tight Junctions in a Isoform-dependent Manner in an in Vitro Blood-Brain Barrier Model*. *Journal of Biological Chemistry*; 286(20): 17536-15545. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225532>
51. Pericot, I., Montalban, X. (2001). *Esclerosis Múltiple*. *Med Integral*; 30(1): 18-24 <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-pdf-13015299>
52. Poels, M.F. *et al.* (2010). *Prevalence and risk factors of Cerebral Microbleeds*. *Stroke*; 41(10): 103-106. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.595181>
53. Riphagen, J., Ramakers, I., Freeze, W. *et al.* (2020). *Linking APOE-ε4, blood-brains barrier dysfunction, and inflammation to Alzheimer’s pathology*. *Neurobiology of Aging*; 85: 96-103 <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.09.020>
54. Rodríguez, B., Rovira, A. *et al.* (2022). *Neuritis óptica: etiopatogenia, diagnóstico, pronóstico y manejo*. *Rev Neurol*; 74(03): 93-104 doi: 10.33588/rn.7403.2021473
55. Rubio, C., Gutierrez, L., Pedraza, O. (2021). *Frecuencias genotípicas y alélicas de apolipoproteína E (APOE) en una muestra de adultos en Bogotá*. *Repert Med Cir*; 30(2): 134-141. doi 10.31260/RepertMedCir.01217372.1008
56. Salloway S, Gur T, Berzin T, Tavares R. *et al.* (2002). *Effect of APOE genotype on microvascular basement membrane in Alzheimer's disease*. *J Neurol Sci*. 203–204:183–187.
57. Sepúlveda, Saavedra, Julio. (2012). *Texto atlas de histología: biología celular y tisular*, McGraw-Hill Interamericana. ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbmhe/detail.action?docID=3214351>.
58. Sepúlveda, M., Arrambide, G., Cobo-Calvo, A. (2022). *Epidemiología del espectro de Neuromielitis óptica. Nuevos y viejos desafíos*. *Rev. Neurol*; 74 (1): 22-34. doi: 10.33588/rn.7401.2021163.
59. Serrano, C. (2022). *Histología del Sistema Nervioso Central*. <https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/neurona>
60. Shi, J., Zhao, B., Vollmer, T., *et al.* (2008). *APOE ε4 allele is associated with cognitive impairment in patients with multiple sclerosis*. *Neurology*; 70(3): 185-190. doi: 10.1212/01.wnl.0000264004.62612.44
61. String. <https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bEhcca8k9xtZ>
62. Tai, L., Riya, T., Marottoli, F. *et al.* (2016). *The role of APOE in Cerebrovascular Dysfunction*. *Acta Neuropathol*; 131(5): 709-723. doi: 10.1007/s00401-016-1547-z

63. Torrades, S. (2004). *Esclerosis Múltiple y otras enfermedades desmielinizantes*. OFFARM; 23(11): 86-90. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13069631>
64. Tortosa, A., Reiriz, J. (2015). *Sistema Nervioso: Anatomía*. Infermera Virtual. Universitat de Barcelona.  
<https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/99/Sistema%20nervioso.pdf?1358605492>
65. Velasco, P.E., Quílez, M.R., López, A.J. y Merino, A. (2011). *Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. Concepto, clasificación y epidemiología*. *Medicine*; 10: 5065-5068
66. Williams, T., Borchelt, D., Chakrabarty, P. (2020). *Therapeutic approaches targeting Apolipoprotein E function in Alzheimer's disease*. *Mol Neurodegeneration*; 15(8). <https://doi.org/10.1186/s13024-020-0358-9>
67. Wu, H., Huang, Q., Yu, Z., Wu, H., Zhong, Z. (2020). *The SNPs rs429358 and rs7412 of APOE gene are association with cerebral infraction but not SNPs rs2306283 and rs4149056 of SLC01B1 gene in southern Chinese Hakka population*. *Lipids Health Dis*; 19(202). <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01379-4>
68. Xuan, C., Zhang, B.-B., Li, M., Deng, K.-F., Yang, T., & Zhang, X.-E. (2011). No association between APOE epsilon 4 allele and multiple sclerosis susceptibility: A meta-analysis from 5472 cases and 4727 controls. *Journal of the Neurological Sciences*, 308(1–2), 110–116. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.jns.2011.05.040>
69. Yaffe, K., Haan, M., Byers, A. et al. (2000). *Estrogen use, APOE, and cognitive decline: Evidence of gene-environment interaction*. *Neurology*; 54(10): 1949-1953. DOI: <https://doi.org/10.1212/WNL.54.10.1949>