

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TÍTULO DEL TRABAJO:

Frecuencia del polimorfismo $\epsilon 4$ del gen APOE en población Mexicana

TRABAJO ESCRITO CORRESPONDIENTE A LA OPCIÓN DE TITULACIÓN
CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA:
Xatzirit Vianey Suazo Islas

DIRIGIDA POR:

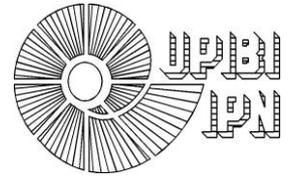
Director Externo:
Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Director Interno:
M. en C. César A. Jiménez Sierra

Evaluador:
Dr. Miguel Ángel Ontiveros Torres

Evaluador:
Dr. Germán Fernando Gutiérrez Hernández

México, D. F. 08 de enero de 2016



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

Autorización de uso de obra

**Instituto Politécnico Nacional
P r e s e n t e**

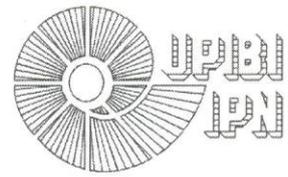
Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Xatzirit Vianey Suazo Islas, manifiesto ser autor (a) y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada Frecuencia del polimorfismo $\epsilon 4$ del gen APOE en población Mexicana, en adelante “La Tesis” y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales tales como en el catálogo de tesis electrónicas del IPN “La Tesis” por un periodo de un año contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a “El IPN” de su terminación.

En virtud de lo anterior, “El IPN” deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de “La Tesis”.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de “La Tesis”, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de “La Tesis”, por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de “La Tesis” o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., 08 de enero de 2016.

Atentamente



SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

ACTA DE TRABAJO ESCRITO

En la Ciudad de México el día 11 de diciembre del 2015, siendo las 15:00 h., se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: Frecuencia del polimorfismo $\epsilon 4$ del gen APOE en población Mexicana, que presenta el alumno Xatzirit Vianey Suazo Islas con número de boleta 2011401016, aspirante a Ingeniería Biotecnológica.

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

COMISIÓN REVISORA.

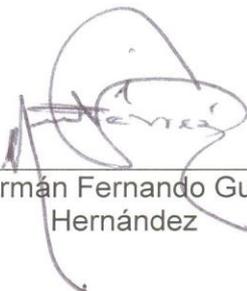
Dr. Marco Antonio Meraz Ríos



M. en C. César A. Jiménez Sierra



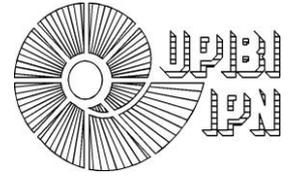
Dr. Miguel Ángel Ontiveros Torres



Dr. Germán Fernando Gutiérrez
Hernández



M. en C. Jonás Martínez Limón



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

Gracias mi Dios, porque por tu infinito amor y misericordia he logrado obtener los frutos que ahora cosecho. Gracias porque día con día me demuestras que estás conmigo, tomándome de la mano para levantarme cada que estoy a punto de caer. Gracias porque tu infinito amor hacia mí me mantienen serena, fuerte y gozosa para enfrentar cada uno de los retos que la vida me presenta.

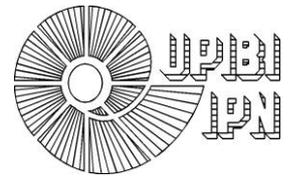
Gracias Padre, porque me rodeas de gente maravillosa que me comparte de su conocimiento experiencia y amor. Pones a cada una de ellas en el momento preciso para que aprenda y crezca como ser humano y profesionista.

Gracias por poner en mi vida a dos grandes, el Dr. Marco Antonio Meraz Ríos, que con su ayuda, bondad, humildad, sencillez, conocimiento, experiencia y calidad humana hizo posible un crecimiento profesional y personal en mí, y al M. en C. César A. Jiménez Sierra porque por su compromiso, amistad, dedicación y ayuda, hizo realidad este logro de una manera más fácil.

Gracias por darme a la mujer que me has dado como madre, por mis abuelitos, tía y primo, porque por amor, apoyo y dedicación hoy estoy aquí.

Gracias a mi Institución y a mi País que me han brindado los recursos necesarios para colocar cimientos firmes en mi carrera profesional.

Gracias a todos y cada uno de ustedes porque han sido pieza clave para lograr esta meta profesional, pero sobre todo, gracias, siempre gracias mi Dios por darme la dicha de vivir y crecer y lograr mis metas.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer y otras formas de demencia son enfermedades neurodegenerativas que afectan a más de 35 millones de personas en todo el mundo, sin algún tratamiento curativo disponible.

El alelo $\epsilon 4$, del gen *APOE*, es un factor de riesgo para la Enfermedad de Alzheimer de tipo tardío. La primera asociación de este alelo con la enfermedad fue dada en 1993 y desde entonces es aceptado, mundialmente, como factor genético.

ApoE es producido principalmente en los astrocitos e hígado. ApoE derivado de los astrocitos es primordial para el metabolismo del colesterol en el cerebro y el aclaramiento del péptido de amiloide- β , una de las principales señales neuropatológicas características de la enfermedad de Alzheimer. ApoE tiene tres isoformas: apoE2, apoE3, apoE4, las cuales, genéticamente, corresponden a los tres alelos comunes: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, definidos por dos polimorfismos de un solo nucleótido (rs429358 y rs7412).

Siendo $\epsilon 4$ el factor de riesgo para aumentar la probabilidad de padecer la Enfermedad de Alzheimer, y $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ un factor de protección para el individuo que expresa dichos alelos, es necesario saber la frecuencia con que cada uno de los alelos se presenta dentro de las poblaciones. No todas las poblaciones poseen frecuencias alélicas y genotípicas iguales, si bien comparten características, su estructura genética las distingue una de otra.

La población Mexicana es una población genéticamente heterogénea debido a la presencia de mestizos y amerindios. Por tal, es necesario hacer estudios en diversas entidades para saber la distribución de los alelos en la República Mexicana y con ello hacer estudios de asociación gen-enfermedad.

Contenido

1.	Introducción	7
1.1.	La demencia.....	7
1.1.1.	Etiologías de la demencia	8
1.1.2.	Datos epidemiológicos de la demencia	8
1.2.	Enfermedad del Alzheimer	10
1.2.1.	Tipos de Alzheimer.....	11
1.2.1.1.	Alzheimer hereditario o temprano	11
1.2.1.2.	Alzheimer esporádico o tardío	11
1.2.2.	Datos epidemiológicos de la enfermedad de Alzheimer	11
1.2.2.1.	Prevalencia e incidencia del Alzheimer en el Mundo	11
1.2.2.2.	Prevalencia del Alzheimer en Latinoamérica.....	11
1.2.2.3.	Prevalencia del Alzheimer en México	12
1.3.	El cerebro.....	12
1.3.1.	Cambios en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer	12
1.3.2.	Mecanismos alterados en la enfermedad de Alzheimer	13
1.4.	Señas de la patología de EA: Proteína Tau y Amiloide Beta	13
1.4.1.	Proteína Tau	13
1.4.2.	Proteína Amiloide Beta (A β).....	14
1.5.	Problemas en la detección del Alzheimer	14
1.6.	Factores involucrados en la patogénesis de la Enfermedad del Alzheimer.....	15
1.6.1.	Factores genéticos y la enfermedad de Alzheimer	15
1.7.	Apolipoproteína E (ApoE).....	16
1.7.1.	Propiedades bioquímicas y estructurales de la Apolipoproteína E (ApoE).....	17
1.7.2.	Señalización neuronal y receptores de ApoE para el transporte de lípidos en el cerebro	18
1.7.4.	Co-morbilidad de APOE con otras enfermedades.....	20
1.7.5.	ApoE y sus receptores como dianas terapéuticas.....	20
1.7.6.	Polimorfismos tipo SNP's en APOE.....	21
1.8.	Discriminación alélica	23
1.8.1.	PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)	23
1.8.2.	Hibridación	23
1.8.3.	PCR en tiempo real	24
1.9.	Equilibrio de Hardy Weinberg	25
1.10.	Estructura genética de las poblaciones.....	26
1.10.1.	Estimaciones de endogamia: Fis	26
1.11.	Población Mexicana.....	27
2.	Objetivos	28
3.	Justificación	28
4.	Materiales y Métodos	29
4.1.	Población de estudio	29
4.2.	Genotipado de APOE	29
4.3.	Análisis estadístico	29
4.3.1.	APOE análisis	30
5.	Resultados y Discusión	30
6.	Conclusiones.....	33
7.	Recomendaciones para trabajos futuros	33
8.	Bibliografía	34

1. Introducción

1.1. La demencia

Desde el comienzo de la humanidad, el fenómeno del envejecimiento ha sido un proceso que no deja de sorprender y preocupar. Nadie es ajeno al envejecimiento y a los problemas que éste acarrea.

Las capacidades neuropsicológicas, mentales, del individuo son el resultado de la interacción entre las capacidades propias del cerebro y el efecto de las experiencias vividas a lo largo de la existencia. Todo lo que somos y sabemos lo tenemos grabado en el cerebro. De hecho, el sistema nervioso, y el cerebro en particular, tiene la capacidad de recibir, analizar, procesar y almacenar información, y también de proporcionar respuestas a los cambios que afectan al medio externo. Todos estos procesos tienen como objetivo final la supervivencia adaptada del individuo y la perpetuación de la especie. Sin embargo, cuando el cerebro se degenera de forma progresiva, el enfermo va perdiendo sus memorias hasta un punto en que termina por desaparecer su identidad.

[1]

A partir de los 85 años de edad, una mujer de cada 4 y un hombre de cada 5 olvidan todo lo que aprendieron en su vida. Al inicio no logran retener pequeños detalles, como dónde pusieron sus llaves o el guiso que dejaron en la estufa. Con el paso del tiempo dejan de recordar acontecimientos recientes, se sienten perdidos en su propia casa y tienen dificultades para comunicarse. La culpable es la demencia, provocada por las alteraciones a nivel molecular que ocurre en las neuronas que termina por matarlas.[2]

La demencia es un síndrome, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, caracterizado por el deterioro de la función cognitiva (capacidad para procesar el pensamiento) más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal. La demencia afecta a la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio.[3] Quienes padecen demencia pueden repetir las mismas historias o preguntas una y otra vez y suelen olvidar cosas tan básicas como vestirse por sí mismos, controlar sus esfínteres e incluso actividades cómo sentarse o caminar.

Más de 800 mil mexicanos sufren hoy alguno de estos padecimientos que se diagnostican como demencia, una enfermedad con más de 60 causas, pero entre el 60 al 70% de los casos el culpable es el Alzheimer, un trastorno neurodegenerativo, progresivo e irreversible que no tiene cura. Se ha estimado que, a nivel global, en 2010 vivían 35.6 millones de personas con demencia, y se prevé que esta cifra se duplicará cada 20 años, alcanzando 115.4 millones en 2050, de los cuales 3 millones serán mexicanos. [4][2]

1.1.1. Etiologías de la demencia

La demencia es un diagnóstico sindromático con muchas etiologías. Entre las principales se encuentran:

Tabla 1. Características de los subtipos de demencia [5]:

Subtipo de demencia	Síntomas tempranos característicos	Neuropatología	Proporción de casos de demencia
Enfermedad de Alzheimer (EA)	Deterioro de la memoria, apatía y depresión.	Placas de amiloide beta y marañas neurofibrilares	50-75%
Demencia Vascular (EVa)	Similar a EA, pero la memoria se ve menos afectada, fluctuaciones en el estado de ánimo más prominente. Fragilidad física	Enfermedad cerebrovascular, infartos en regiones críticas	20-30%
Demencia por cuerpos de Lewy (DCL)	Fluctuaciones en la habilidad cognitiva. Alucinaciones visuales. Parkinsonismo (temblor y rigidez)	Cuerpos de Lewy (alfa- sinucleína)	<5%
Demencia frontotemporal	Cambios de personalidad, cambios en el estado de ánimo, desinhibición, dificultades en el lenguaje	Daño limitado en los lóbulos frontales y temporales	5-10%

Estudios post-mortem sugieren que muchas personas con demencia han padecido la Enfermedad de Alzheimer junto con la demencia vascular.

1.1.2. Datos epidemiológicos de la demencia

1.1.2.1. Prevalencia¹ e incidencia² de la demencia en el Mundo

La demencia afecta a nivel mundial a unos 47,5 millones de personas, de las cuales un poco más de la mitad (58%) viven en países de ingresos bajos y medios. Cada año se registran 7,7 millones de nuevos casos.

Casi todos los estudios realizados, aún en diferentes áreas del Mundo, demuestran que las prevalencias aumentan con la edad, casi duplicándose cada 5 años de vida. En la actualidad, el factor más importante que determina el aumento en el número de personas con demencia es el aumento global en la expectativa de vida. Hay un aumento proporcional en el número de individuos de la tercera edad, que secundariamente provocará un aumento proporcional en el número de nuevos casos de demencia.[6]

¹ Número total de personas que presentan síntomas o padecen la enfermedad durante un periodo de tiempo, dividido por la población con posibilidad de llegar a padecer dicha enfermedad

² Tasa a la cual nuevos casos surgen en a población y es por lo tanto una medida de riesgo de desarrollar la enfermedad

Los nueve países con las mayores cifras (un millón o más) de personas con demencia en 2010 fueron: China (5.4 millones), EUA (3.9 millones), India (3.7 millones), Japón (2.5 millones), Alemania (1.5 millones), Rusia (1.2 millones), Francia (1.1 millones), Italia (1.1 millones) y Brasil (1.0 millón).[4]

La incidencia a los 80 años es mayor en América del Norte (20,6 / 1.000 personas-año) y en Europa (15,1) que en otros países (8,3).

La incidencia ha sido levemente más alta entre las mujeres (13,7 / 1.000 personas-año) que en los hombres (10,6/ 1.000 personas-año).

1.1.2.2. Prevalencia de la demencia en México

- **Según el sexo**

En México, la demencia ocupa el cuarto lugar de causa de muerte en la población respecto a trastornos mentales y enfermedades neuropsiquiátricas. En relación al sexo, se tienen elevadas tasas de mortalidad en mujeres en comparación con los hombres (figura 1, [7]). La Demencia ha formado parte de las enfermedades más frecuentes y por lo tanto una causa de muerte relevante en las mujeres.

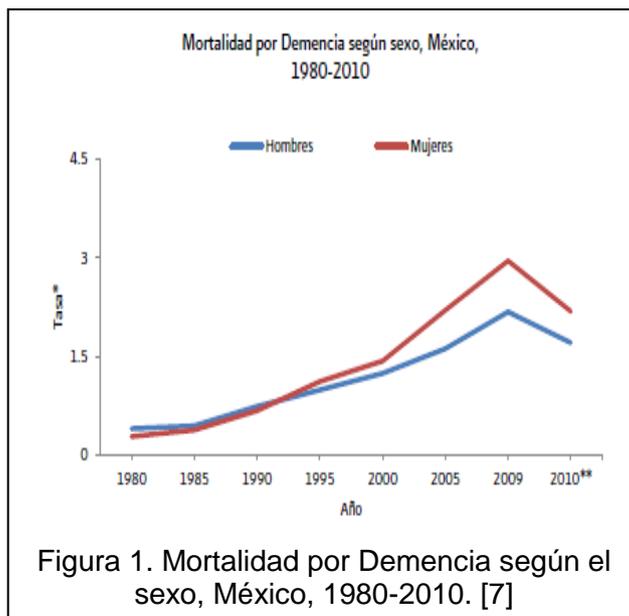


Figura 1. Mortalidad por Demencia según el sexo, México, 1980-2010. [7]

Del año 1980 a 2009, la tasa de mortalidad por demencia en hombres, pasó de 2.4% a un 10.5%, siendo de la cuarta a la tercera causa de muerte. Mientras que en mujeres, pasó de un 7.6% a un 41.4%; ocupando el primer lugar de causa de muerte en mujeres en esos últimos años. [7]

- **Según la entidad federativa**

Aunque no hay evidencias de altas tasas de mortalidad en la población años atrás, en 1980, Yucatán contó con 1.0 defunciones por cada 100 mil habitantes, en 1990 Jalisco tuvo una tasa de 1.4 por cada 100 mil habitantes y para el 2000, Sinaloa ocupó el primer lugar (figura 2, [8]).

En el año 2009, las tasas de mortalidad por esta causa señalaron un súbito incremento en comparación con los años anteriores. La entidad federativa con la mayor tasa fue Sonora (5.1 por cada 100 mil habitantes). [7]

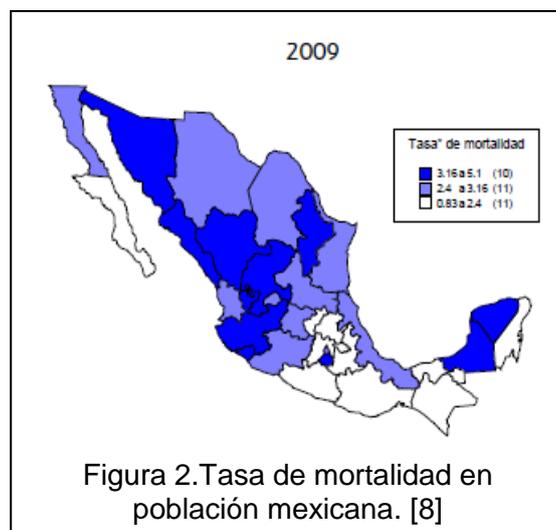


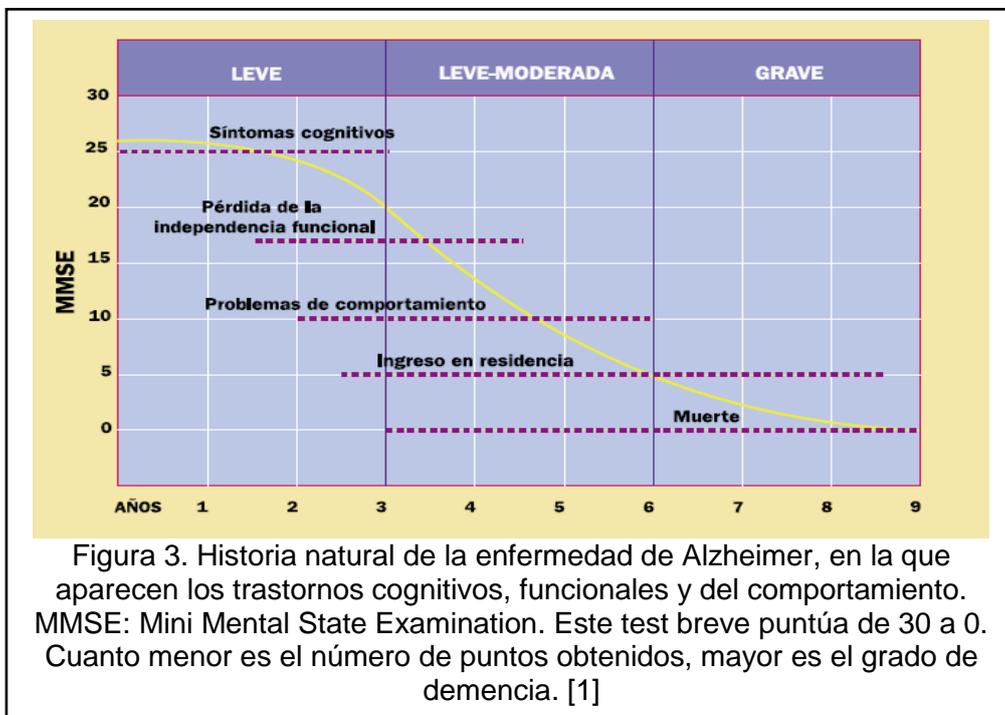
Figura 2. Tasa de mortalidad en población mexicana. [8]

1.2. Enfermedad del Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un tipo de demencia neurodegenerativa progresiva que se caracteriza por rasgos clínicos y neuropatológicos. Este tipo de demencia es el más común entre personas de edad avanzada [9] y la presencia de factores de riesgo vascular y del alelo $\epsilon 4$ de APOE son factores de riesgo aceptados universalmente. [10]

Entre las principales características encontradas en los rasgos clínicos y neuropatológicos que presenta un paciente con Enfermedad de Alzheimer, se encuentran:

- Rasgos neuropatológicos: Acumulación extracelular de placas de Amiloide β y una acumulación intracelular de la proteína Tau hiperfosforilada en forma de marañas neurofibrilares. Asociados con cambios que incrementan los niveles de inflamación, estrés oxidativo y muerte de células nerviosas. Tanto las placas de amiloide β como las marañas neurofibrilares están asociadas con la pérdida progresiva del número de neuronas y sinapsis entre ellas, con atrofia y dilatación de los ventrículos laterales del cerebro debido a una disminución en el tejido cerebral, las cuales son las características generales del daño cerebral por demencia.
- Rasgos clínicos: Alteraciones cognitivas (memoria y otras capacidades mentales), alteraciones funcionales (pérdida progresiva de independencia en las actividades de la vida diaria) y alteraciones psicológicas y de comportamiento (ansiedad, delirios, alucinaciones, vagabundeo, agresión) (figura 3). [1]



Se considera que un paciente puede vivir en promedio entre 8 y 10 años desde el momento del diagnóstico (figura 3). En general, se dice que la enfermedad evoluciona más rápidamente cuanto más joven es el paciente en el momento de declararse la enfermedad.

1.2.1. Tipos de Alzheimer

Una de las maneras en las que se puede dividir la EA es atendiendo a su edad de inicio: anterior a los 60 años (formas tempranas) o posterior a la séptima década (formas tardías).[11]

1.2.1.1. Alzheimer hereditario o temprano

Menos del 1% de los casos de EA son causados por herencia de mutaciones genéticas en ciertos genes. El estudio genético de las formas hereditarias de enfermedad de Alzheimer de inicio precoz ha permitido identificar más de 185 mutaciones en tres genes que producen la enfermedad: Proteína Precursora de Amiloide (APP), Presenilina 1 (PSEN1) y Presenilina 2 (PSEN2). La herencia de cualquiera de estas mutaciones genéticas acelera la producción de A β , lo que resulta en el desarrollo de AD generalmente antes de la edad de 60 años, conocido comúnmente como EA familiar de comienzo temprano (FAD).[12][13]

1.2.1.2. Alzheimer esporádico o tardío

La aparición tardía o esporádica de EA representa la mayoría de los casos (95%) y los primeros síntomas aparecen después de los 65 años. En la enfermedad de inicio tardío, el factor de riesgo genético mejor estudiado está relacionado con el gen codificador de la apolipoproteína E. [13]. A diferencia de alguna de las formas tempranas, los genes implicados en la EA tardía no son determinantes, aunque confieren una susceptibilidad al individuo, que a su vez es modulada por otros genes con efectos protectores o potenciadores de riesgo. [11]

1.2.2. Datos epidemiológicos de la enfermedad de Alzheimer

1.2.2.1. Prevalencia e incidencia del Alzheimer en el Mundo

Se pronostica que para el 2050 habrá un nuevo caso de EA por cada 33 personas o cerca de un millón de nuevos casos por año. [9]

En cuanto a las diferencias entre países y regiones geográficas, se ha determinado según los meta-análisis de Jorm y colaboradores que la EA es la demencia más común en poblaciones caucásicas. [6].

Datos más actuales parecen indicar que la EA tiene mayor prevalencia en países del Este Asiático. Esto podría deberse a que la expectativa de vida ha aumentado en estos países.

1.2.2.2. Prevalencia del Alzheimer en Latinoamérica

Acorde a los cálculos proyectados a 2020 y 2040 la prevalencia en mayores de 60 años será de 4.1 y 9.1% para la región Latinoamérica evidenciando un aumento significativo si comparamos con

las cifras estimadas en 2001, 1.8%. Este incremento se espera con un mayor impacto en países en vías de desarrollo frente a países desarrollados. [14].

1.2.2.3. Prevalencia del Alzheimer en México

En México, la prevalencia de Alzheimer se duplica cada quinquenio a partir de los 65 años de edad; es decir, es de 7% a esa edad, 15% en los mayores de 70 años y 30% en quienes tienen entre 75 y 80 años. Además que en México hay 800 mil personas con demencia, de las cuales más del (60%) padece Alzheimer. [8].

1.3. El cerebro

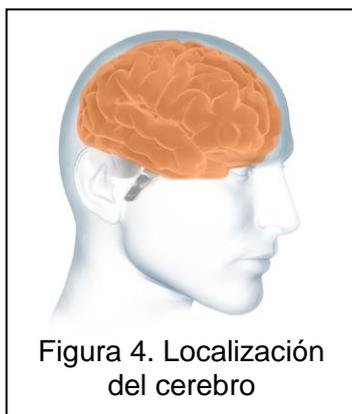


Figura 4. Localización del cerebro

El cerebro es el órgano más poderoso del cuerpo humano (figura 4). El cerebro es el encargado de procesar información de nuestro cuerpo, operar órganos internos, generar pensamientos y emociones, almacenar recuerdos y controlar los movimientos.

Las tres partes más importantes son:

- El cerebro. Es el encargado de recordar, resolver problemas, generar pensamientos y sentimientos y controlar movimientos.
- El cerebelo. Se encuentra localizado atrás del cerebro. Controla la coordinación y el balance.
- El tronco cerebral. Conecta el cerebro con la médula espinal. Controla las funciones automáticas como: respiración, digestión, latidos del corazón y presión arterial.

Por lo tanto, el cerebro es la parte que se afecta durante la patología de Alzheimer, habiendo pérdida en la generación de pensamientos, recuerdos, etc. [15]

1.3.1. Cambios en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer

Aún no se sabe exactamente cómo comienza el proceso de la enfermedad de Alzheimer, pero se tienen evidencias de que los daños en el cerebro surgen una década o más antes de que los síntomas se hagan evidentes. Durante la fase preclínica de la enfermedad, los pacientes no presentan síntomas, pero el cerebro comienza a sufrir cambios importantes. Depósitos anormales de proteínas forman placas de amiloide β y marañas neurofibrilares de tau en el cerebro (señas de la EA), provocando que las neuronas sanas comiencen a trabajar con menos eficiencia y con el tiempo pierdan su capacidad de funcionar y comunicarse entre sí, ocasionando su muerte. En poco tiempo, el daño se extiende hasta el hipocampo y a medida que más neuronas mueren, las regiones del cerebro afectadas comienzan a encogerse, y para la etapa final de la enfermedad de Alzheimer, el tejido cerebral se ha reducido significativamente y se muestran ensanchamientos de los surcos (figura 5).

1.3.2. Mecanismos alterados en la enfermedad de Alzheimer

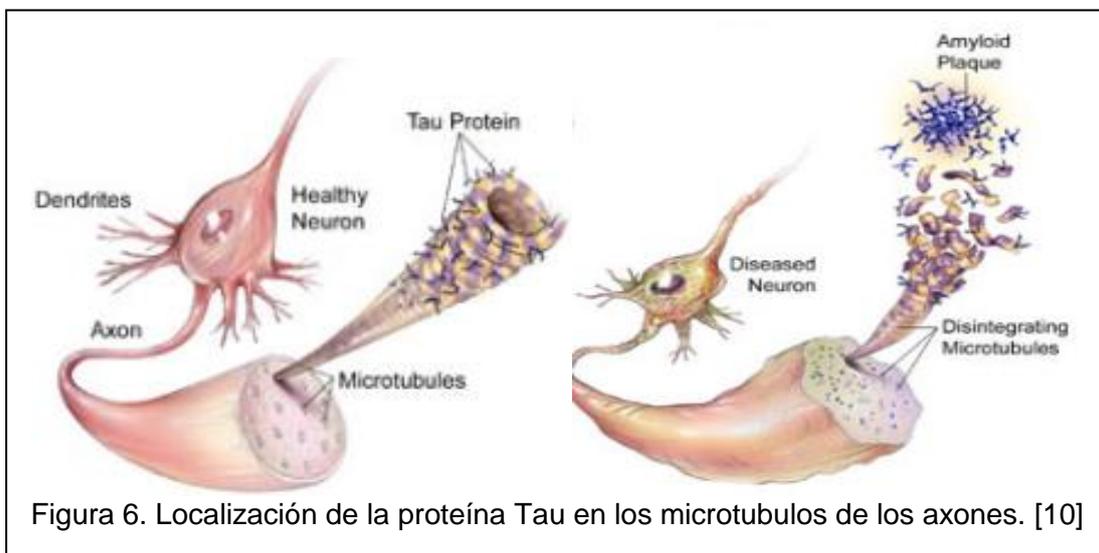
Algunos mecanismos patológicos descritos en la enfermedad de Alzheimer son: Formación de las placas de amiloide β , daño en los filamentos que dan forma a las neuronas (citoesqueleto): marañas neurofibrilares, trastorno en el metabolismo energético/glucosa, pérdida de sinapsis y trastornos en los neurotransmisores y receptores, alteraciones del metabolismo de radicales libres, muerte prematura de las neuronas por programación genética y trastorno de la regulación del calcio neuronal (su exceso dentro de la neurona actúa como tóxico).



1.4. Señas de la patología de EA: Proteína Tau y Amiloide Beta

1.4.1. Proteína Tau

La proteína tau pertenece a una familia de proteínas que se caracteriza por estar asociadas a microtúbulos y ser muy abundante en el sistema nervioso central, donde se distribuye especialmente en los axones (figura 6). Esta proteína se encarga de estabilizar al citoesqueleto neuronal manteniendo el andamiaje celular para que las neuronas se comuniquen entre sí (flujo



axonal). Sin embargo, si se altera la proteína habiendo una pérdida del balance entre kinasas y fosfatasa neuronales y produciendo una hiperfosforilación de la proteína, Tau se desprende de su lugar fuera de la neurona y entra en ella provocando un ambiente tóxico. Para protegerse, la neurona forma marañas en formas fibrosas (llamadas marañas neurofibrilares) que le permiten

vivir pero ya no hay comunicación con el resto de neuronas. Esto provoca una especie de cortos circuitos que llevan a la muerte masiva de neuronas.[10][2].

1.4.2. Proteína Amiloide Beta (A β)

A β es un fragmento de la proteína precursora de Amiloide (APP), una proteína transmembrana que posee una región extracelular, otra intramembranal y otra citoplásmica y que se produce no sólo en el cerebro en condiciones patológicas, sino en todos los tipos de células (figura 7).

A β se ha convertido en elemento sustancial de la patogenia de la enfermedad de Alzheimer y mutaciones en el gen de la APP causan el padecimiento de la EA precoz de carácter hereditario.

La APP es fisiológicamente seccionada por una α -secretasa, pero cuando otro tipo de enzima participa en la degradación de APP, se origina el péptido de Amiloide Beta.

Para la formación de A β es necesario que una β -secretasa actúe. Primero se genera la posición N-terminal de la proteína, rompiendo la APP en su sección extracelular originando β -APP y un fragmento C-terminal de 99 residuos asociado a la membrana. Posteriormente actúa la γ -secretasa que hidroliza el residuo en medio del dominio transmembrana para originar la proteína A β que suele tener 42 residuos, por lo que suele llamarse A β 42 (figura 7). Diversas mutaciones del gen APP son capaces de producir la Enfermedad de Alzheimer. La doble mutación 670/671, en el extremo N-terminal, favorece la acción de la β -secretasa aumentando la producción de péptido A β .

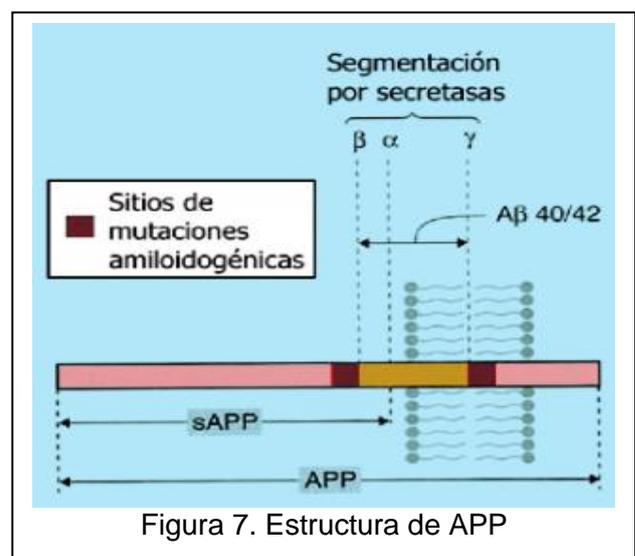


Figura 7. Estructura de APP

1.5. Problemas en la detección del Alzheimer

Se conoce que la principal barrera para implementar terapias y por lo tanto reducir los costos de la enfermedad, es la dificultad que tiene el personal médico en los servicios de atención primaria para detectar el compromiso cognoscitivo. Esta falla en el diagnóstico se atribuye en primer lugar a la carencia del conocimiento de las enfermedades demenciales, en particular en sus estadios iniciales por parte de los médicos, la falta de uso de los métodos de tamizaje para demencia y la errada percepción de que nada puede hacerse para tratar dichas enfermedades. [14]

Un diagnóstico temprano es vital para intentar alentar el proceso neurodegenerativo, sin embargo, no se puede realizar un diagnóstico clínico que confirme exactamente el tipo de demencia que se presenta y por ende el tratamiento a seguir, sólo hasta revisar el tejido post mortem que lo confirme.[2].

Hasta la fecha, no se han podido establecer biomarcadores de diagnóstico para el daño cerebral relacionados con la demencia debido a que los mecanismos neuropatológicos vinculados a este daño aparecen mucho antes que las manifestaciones sintomáticas.

Las estrategias hacia las que se ha dirigido la prevención de la demencia, han sido encaminadas comúnmente con el retraso de la aparición clínica de la enfermedad, en lugar de evitar el desarrollo de la neuropatología subyacente.

1.6. Factores involucrados en la patogénesis de la Enfermedad del Alzheimer

El Alzheimer es una enfermedad compleja y multifactorial, genéticamente heterogénea, que hasta la fecha no tiene cura ni tratamiento efectivo. Factores como la edad, la herencia familiar, la genética y el ambiente son importantes para el desarrollo de EA. Las investigaciones sugieren que las enfermedades vasculares predisponen a la enfermedad de Alzheimer al igual que a la demencia vascular. En estudios de incidencia de corta y larga latencia, fumar aumenta el riesgo para la enfermedad de Alzheimer. La diabetes también es un factor de riesgo y en estudios de cohortes a más largo plazo, la hipertensión a mediana edad y el colesterol elevado están asociados con el comienzo de la enfermedad de Alzheimer en la vejez.

Por lo tanto, las estrategias más prometedoras han sido la eliminación de la inactividad física (12,7% de casos de Alzheimer prevenidos), fumar (13,9% prevenidos), y el bajo nivel educativo (19,1% prevenidos). Esto es debido a que son factores relativamente comunes y están fuertemente asociados con la enfermedad de Alzheimer. Si se eliminaran todos los factores de riesgo, se podría prevenir hasta 50,7% de todos los casos de Alzheimer en el mundo.

Además, en los últimos años, se ha observado la importancia de ciertos genes como factores de predisposición para el desarrollo de EA y algunos de ellos, reconocidos como posibles agentes causantes de la enfermedad o implicados en factores de riesgo son: El gen de la proteína precursora de amiloide (PPA) en el cromosoma 21, el factor de susceptibilidad es el alelo $\epsilon 4$ del gen de la Apo-E (apolipoproteína E) en el cromosoma 19 y actualmente el gen de TOMM40 en el cromosoma 19.

1.6.1. Factores genéticos y la enfermedad de Alzheimer

Si bien se ha demostrado la asociación entre factores genéticos y EA, todo parece indicar que existe una importante heterogeneidad genética. Los marcadores genéticos de esta enfermedad que se conocen actualmente son de dos tipos (figura 8)[13]:

- **Determinantes.** Se trata de mutaciones de ciertos genes, cuya presencia determina inexorablemente la aparición de la EA. Se transmite de manera autonómica dominante, con una alta penetrancia y son responsables de la enfermedad hereditaria, de inicio precoz (entre 35 y 55 años), que afecta a algunas familias. Afortunadamente, son mutaciones muy infrecuentes y, por tanto, responsables de muy pocos casos. Las más frecuentes son las que afectan al gen que codifica la presenilina 1 ubicado en el cromosoma 14, que pueden ser responsables de hasta el 70% de las formas familiares de inicio precoz. Otras mutaciones afectan al gen del cromosoma 21 que codifica la proteína precursora del amiloide y al gen que codifica la presenilina 2, ubicado en cromosoma 1.
- **Predisponentes.** Su presencia aumenta el riesgo de padecer la EA. Destaca el alelo E4 del gen que codifica la apolipoproteína E (gen APOE), ubicado en el cromosoma 19. Este gen, a su vez, posee tres alelos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$), que pueden presentarse en homocigosis o heterocigosis y determinan las tres isoformas de esta apolipoproteína: apoE2, apoE3 y apoE4. La posesión del alelo $\epsilon 4$, especialmente en homocigosis, se ha asociado a un mayor riesgo de EA. Los riesgos relativos estimados para el alelo $\epsilon 4$ en heterocigosis con respecto al alelo E3 varían entre 1.5 y 5, mientras que en homocigosis oscilan entre 5 y 40. [16].

Gen	Mutación o ligamento genético	Proteína	Primera referencia	Herencia	Efecto en patogénesis	Edad de inicio
APP	Cromosoma 21 21q21	Proteína precursora de amiloide	Goate ⁴⁰	Dominante	Altera la producción (radio A β 42/A β 40 \uparrow) y agregación del A β amiloide	40-65 años
PS1	Cromosoma 14 14q24	Presenilina 1	Sherrington ²	Dominante	Altera la producción (radio A β 42/A β 40 \uparrow) del A β amiloide	25-60 años
PS2	Cromosoma 1 1q31	Presenilina 2	Levy-Lahad ⁵ Rogaev ⁹	Dominante	Altera la producción (radio A β 42/A β 40 \uparrow) del A β amiloide	45-84 años
Apo E	Cromosoma 19 19q13	Apolipoproteína E	Schmechel ¹¹ Strittmatter ¹²	Factor de riesgo	Desconocido ¿Agregación de A β amiloide? ¿Metabolismo lipídico?	> 50 años

Figura 8. Principales genes involucrados en la enfermedad de Alzheimer. [13]

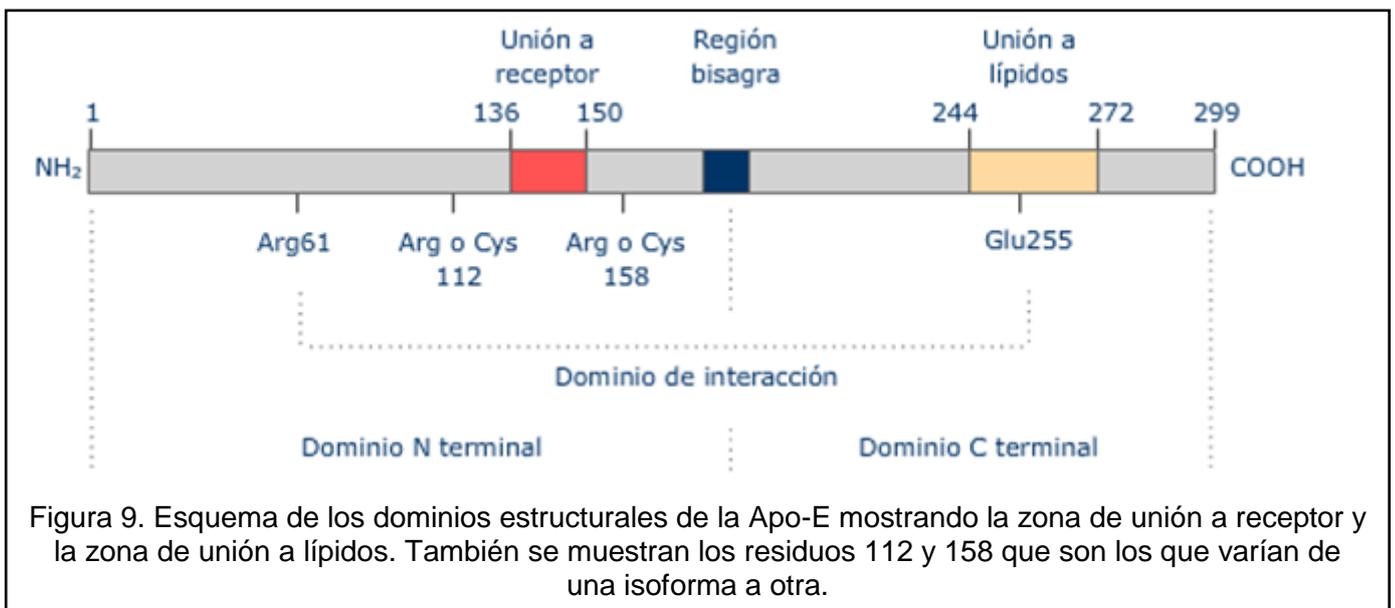
1.7. Apolipoproteína E (ApoE)

La ApoE es una lipoproteína que se halla tanto en el plasma sanguíneo como en el líquido cefalorraquídeo. La función de ApoE es la de transportar el colesterol y triglicéridos que intervienen en el mantenimiento y reparación de las membranas celulares y su asociación con lípidos es esencial para lograr su estabilidad.

Una gran proporción (90%) de esta lipoproteína es producida en el hígado, mientras que en menor porcentaje, también se produce en hepatocitos, macrófagos, astrocitos, microglía, y en situaciones de estrés, en neuronas. La ApoE ha sido identificada en las placas de Amiloide β , marañas neurofibrilares y todas las lesiones que se encuentran en el cerebro de las personas con enfermedad de Alzheimer.

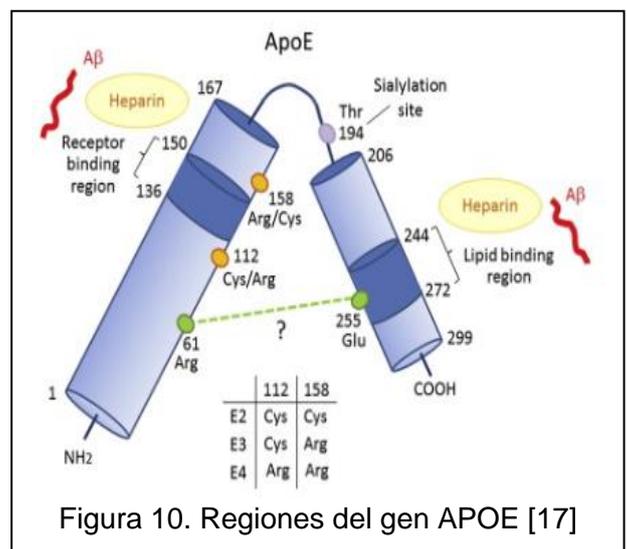
Existen tres formas diferentes (alelos) del gen de la ApoE: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ (figura 9), definidos por dos polimorfismos de nucleótido simple (SNP's), rs429358 y rs7412. Así pues, una persona determinada dispone de un par de alelos, de forma que su carga genética será cualquiera de las combinaciones posibles: 2/2, 2/3, 2/4, 3/3, 3/4 o 4/4.

No obstante, no todos los genotipos tienen la misma frecuencia en la población. El alelo $\epsilon 3$, cisteína en el codón 112 y arginina en 158, está presente en el 75% de las personas de raza caucásica; el alelo $\epsilon 4$, arginina en el codón 112 y 158, entre el 20 y 30% de la población general, y el $\epsilon 2$, cisteína en los codones 112 y 158, en el 10%.



1.7.1. Propiedades bioquímicas y estructurales de la Apolipoproteína E (ApoE)

ApoE está formada por 299 aminoácidos organizados en 2 dominios independientes: el N-terminal y el C-terminal conectados por una región bisagra que es flexible. La región que interactúa con los receptores de ApoE está en el dominio N-terminal,



mientras que la región de unión a lípidos se encuentra en el dominio C-terminal (figura 10). [17]
Las 3 isoformas $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ difieren únicamente en las posiciones 112 y 158. Tales diferencias afectan la estructura y función de la proteína, así como la unión a lípidos y receptores, ocasionando que Apo- $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ se unan a lipoproteínas de alta densidad (HDL), mientras Apo- $\epsilon 4$ se liga preferencialmente con lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Lo anterior se debe a que la presencia de Arginina en la posición 112 afecta la conformación de la Arginina 61 (en el dominio N-terminal) provocando una interacción con el Glutámico 255 del dominio C-terminal. Este tipo de interacción entre los dominios N y C terminal afecta la estabilidad de la molécula (estructural y funcionalmente) dejándola en un estado inestable que puede influir en la patogenia del Alzheimer. [12]

1.7.2. Señalización neuronal y receptores de ApoE para el transporte de lípidos en el cerebro

ApoE regula procesos de señalización celular uniéndose a varios ligandos extracelulares y a varias proteínas adaptadoras intracelulares. La ruta de señalización mejor caracterizada es la mediada por los receptores APOER2 y VLDLR a nivel extracelular y la ruta de la relina a nivel intracelular (crucial en la migración neuronal, en el desarrollo dendrítico a nivel de la médula y en la plasticidad sináptica). En neuronas primarias, las distintas isoformas de ApoE afectan de forma distinta a las diferentes cascadas de señalización. ApoE4, incrementa los niveles basales de Ca^{2+} , mientras que ApoE3, unido a lipoproteínas, ofrece una mayor protección frente a la apoptosis que ApoE4.[17]

La función primaria de ApoE en el cerebro es el transporte de colesterol principalmente en astrocitos y neuronas. El colesterol es un componente esencial para mantener la integridad sináptica y la función neuronal. La síntesis de colesterol en neuronas es reducida lo que hace necesario un transporte activo de colesterol para mantener la función neuronal.

Se ha propuesto que existe una relación entre la enfermedad de Alzheimer y el metabolismo del colesterol, pues los niveles de colesterol en cerebro son más bajos en enfermos de Alzheimer que en personas sanas. Ratones que expresan ApoE4 tienen en cerebro niveles de colesterol por debajo de lo normal, aun cuando sus cifras de colesterol a nivel periférico sean elevadas, evidenciando con ello que ApoE4 es menos eficiente como transportador de colesterol en cerebro que el resto de isoformas.

1.7.3. ApoE y la enfermedad de Alzheimer

La presencia de por lo menos una copia del alelo $\epsilon 4$ del gen de la ApoE en el cromosoma 19 es un factor de riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer. En cambio, la presencia de los alelos 2 y 3 son un factor de protección (Figura 11). Más del 50% de los pacientes con Alzheimer son portadores de, al menos, una copia del alelo E4, frente a un 15% de la población que no padece la enfermedad. Sin embargo, si no se tiene ningún alelo $\epsilon 4$, el riesgo disminuye hasta situarse alrededor del 10%.

Aunque el alelo $\epsilon 4$ representa un factor de riesgo, la enfermedad puede

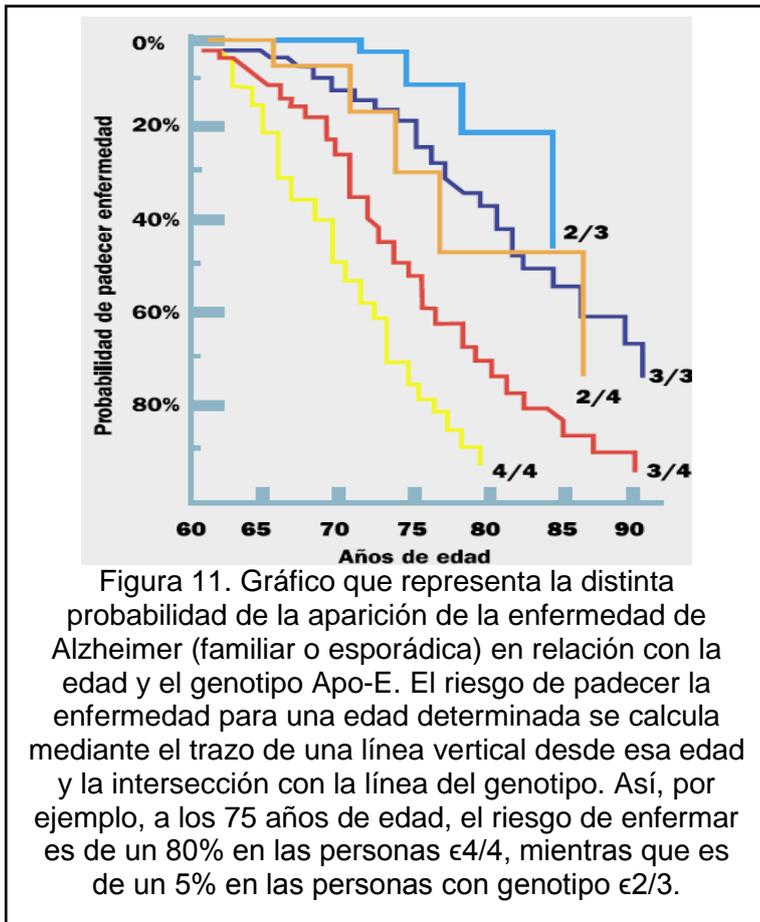


Figura 11. Gráfico que representa la distinta probabilidad de la aparición de la enfermedad de Alzheimer (familiar o esporádica) en relación con la edad y el genotipo Apo-E. El riesgo de padecer la enfermedad para una edad determinada se calcula mediante el trazo de una línea vertical desde esa edad y la intersección con la línea del genotipo. Así, por ejemplo, a los 75 años de edad, el riesgo de enfermarse es de un 80% en las personas $\epsilon 4/4$, mientras que es de un 5% en las personas con genotipo $\epsilon 2/3$.

desarrollarse en personas que no sean portadoras de este alelo o, por el contrario, puede no manifestarse en las personas portadoras. En consecuencia, ser portador de uno o dos copias del alelo $\epsilon 4$ no es, en un caso concreto, un predictivo seguro de sufrir la enfermedad. [1]

El mecanismo de acción de la ApoE en el cerebro para la enfermedad de Alzheimer no se conoce con total precisión, pero se supone que interviene en la producción, distribución y aclaramiento del péptido A β . Es probable que su influencia se ejerza sobre la proteína tau a la que se puede unir. Así, las isoformas $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ son más eficientes que la $\epsilon 4$ para proteger y secuestrar las proteínas asociadas a los microtúbulos, evitando la hiperfosforilación de la proteína tau y la degeneración neurofibrilar. También se ha sugerido que ApoE está implicada en los procesos de plasticidad sináptica y que el alelo $\epsilon 4$ es menos eficiente en este papel. Todos los mecanismos en los que APOE y su alelo $\epsilon 4$ están presentes sugieren que su relación con la enfermedad de Alzheimer es inespecífica. [13]

1.7.4. Co-morbilidad de APOE con otras enfermedades.

Enfermedades cardiovasculares

La Apolipoproteína E (ApoE) juega un papel importante en la regulación del metabolismo lipídico en humanos. En población normal, la isoforma $\epsilon 3$ es la más prevalente, mientras que las $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$ se encuentran en menos prevalencia en la población y están asociados a hiperlipidemia (presencia de niveles elevados de lípidos en sangre). La variabilidad en la unión de ApoE a los receptores de LDL resulta en diferentes niveles de lípidos y lipoproteínas y el riesgo de enfermedad coronaria (CHD) entre los individuos predispuestos a enfermedades del corazón. Varios estudios han indicado que los factores de riesgo cardiovascular clásicos como el tabaquismo, la presión arterial alta, colesterol HDL bajo, y también de alto colesterol son importantes predictores de eventos cardiovasculares en personas de edad avanzada, así como sujetos de mediana edad. Últimamente, los nuevos factores de riesgo cardiovascular como apolipoproteínas, incluyendo ApoE, han sido un foco de investigación interesante. Defectos en la proteína ApoE podrían disminuir su capacidad para unirse a los receptores, que entonces llevaría a un nivel de colesterol en sangre elevado. [18].

En población Maya, se ha encontrado que la frecuencia alélica de cada isoforma del gen ApoE es de: ausencia del alelo $\epsilon 2$, frecuencia de $\epsilon 3$ de 0.911 y 0.089 de $\epsilon 4$. También se observó, que la presencia del alelo Apo- $\epsilon 4$ no está asociada con el aumento de los niveles de colesterol. Para otro grupo de poblaciones, el genotipo $\epsilon 3$ - $\epsilon 4$ ha reportado altos niveles de colesterol. La ausencia del efecto del alelo $\epsilon 4$ en los niveles de colesterol en población Maya, se puede deber a: un pequeño número de individuos que presentan el genotipo $\epsilon 3$ - $\epsilon 4$, heterogeneidad dentro del fenotipo $\epsilon 4$, o una dieta baja en colesterol. [19].

1.7.5. Apoe y sus receptores como dianas terapéuticas

Una aproximación al tratamiento del Alzheimer es regular la expresión de APOE a nivel cerebral actuando sobre su promotor. Teniendo en cuenta la compleja función de APOE no es fácil modular su expresión de forma favorable. Para ello habría que tener en cuenta las distintas isoformas, el estadio de la enfermedad y la presencia de otras patologías.

Otros intentos de tratamiento se orientan a impedir la interacción entre ApoE y Amiloide beta. Un péptido sintético que no es tóxico llamado Abeta12-28, similar a la región de unión con ApoE, atraviesa la barrera hematoencefálica y parece reducir los niveles globales de amiloide beta, las placas de amiloide y la angiopatía amiloide cerebral. Este mismo péptido fue capaz de mejorar la memoria en dos modelos de amiloide de ratón. Todo esto sugiere que disminuir la interacción entre ApoE y Amiloide beta podría disminuir los niveles de amiloide beta a nivel cerebral.

Otra diana potencial son los receptores de ApoE. LRP1 está disminuido en cerebros con Alzheimer y sería interesante probar si restaurar sus niveles aumenta el aclaramiento de Amiloide beta y reduce la patología de Alzheimer. APOER2 y VLDLR están implicados en la ruta de señalización de la relina, que es fundamental en plasticidad y reparación sináptica. Componentes que estimulen la función de estos receptores podrían ser beneficiosos para los pacientes de Alzheimer. Hay que tener en cuenta que aumentar la expresión de ApoE parece incrementar el riesgo para otras enfermedades como el cáncer. [17]

1.7.6. Polimorfismos tipo SNP's en APOE

El ADN se distribuye a lo largo de los cromosomas, que en humanos son 22 autosomas o pares de cromosomas homólogos y un par de cromosomas sexuales. Un locus, loci en plural, se refiere a una región específica en un cromosoma. Dado que nuestras células son diploides³, hay dos posibles secuencias de ADN heredadas independientemente para un locus determinado y un individuo: alelos⁴. Estos dos alelos forman el genotipo de ese individuo para ese locus en particular.

En la mayor parte del genoma, la secuencia de ADN es idéntica para todos los humanos, por lo tanto se trataría de loci monomórficos. Para una porción de loci se han detectado una serie de mutaciones que se han mantenido a lo largo del tiempo y que consisten en un cambio de base en las secuencias de ADN, lo que implica que existan diferentes alelos para un locus determinado, loci polimórficos.

Los polimorfismos más habituales, objeto de estudio, son los SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Un SNP describe un cambio en una sola base. Para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo, la variante debe aparecer al menos en el 1% de la población, de lo contrario es considerado como mutación.[20]

Existen variaciones funcionales que pueden producir una enfermedad o susceptibilidad a ésta y pueden estar localizados en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen, en intrones (modulando la estabilidad de la proteína) en sitios de "splicing" (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas.

Con ayuda de los polimorfismos genéticos se puede determinar la cantidad de entrecruzamiento entre diferentes grupos de la misma especie (flujo genético), y la información ser usada para identificar poblaciones únicas.[21]

³ Diploide. Célula que en su célula poseen dos juegos de cromosomas homólogos

⁴ Un alelo es una, dos o más versiones de un gen. Cuando los alelos heredados son iguales, el individuo es homocigoto para ese gen, pero cuando los alelos son diferentes el individuo es heterocigoto.

Hay tres variantes alélicas relativamente comunes de ApoE, que se define por dos SNPs, rs429358 y rs7412, conocidos como ApoE-ε2, ApoE-ε3, y ApoE-ε4. Las proteínas producidas por estos genes se llaman ApoE2, ApoE3 y ApoE4.[22]

SNP y estudios de asociación a enfermedades

Los estudios de asociación permiten identificar genes relacionados con distintas enfermedades. El supuesto SNP responsable de una enfermedad es genotipificado directamente. El reto de este tipo de estudios es predecir o determinar a priori cuáles SNP's son los responsables del fenotipo de interés.

1.7.6.1. rs429358

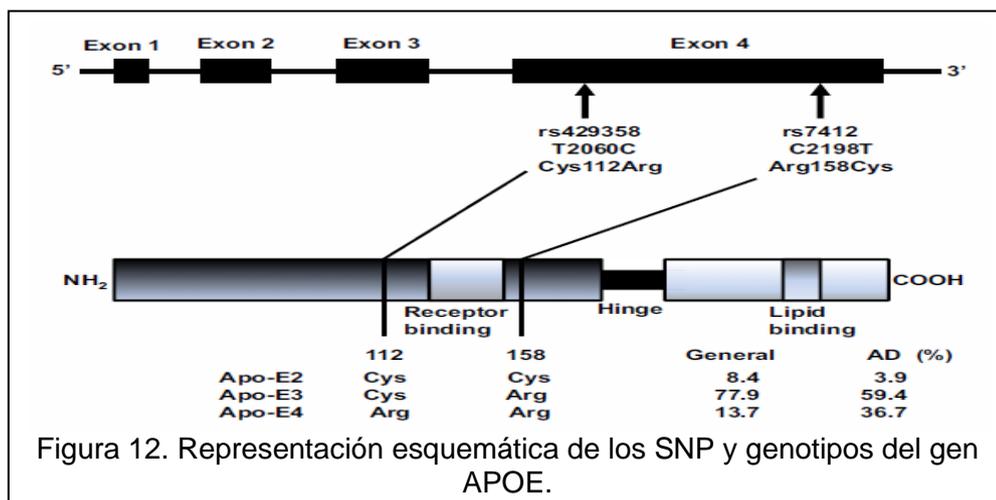
Este SNP está localizado en el cuarto exón del gen de APOE y el alelo más común es el (T). Si el alelo (C) de éste SNP y, en el mismo cromosoma, el alelo (C) del SNP rs7412 se combinan, el resultado se conoce como alelo APOE ε4.[23]

Codifica el cambio de amino ácido (Cys112Arg) en exón 4 (figura 12).

CGTG[C/T]GCGG

CGC→Arginina

TGC→Cisteína



1.7.6.2. rs7412

Este SNP está localizado en el cuarto exón del gen de APOE y el alelo ancestral es el (C). Codifica el cambio de amino ácido (Arg158Cys) en exón 4. [24][25]

GAAG[C/T]GCCT

CGC→Arginina

TGC→Cisteína

Tabla 2. Variantes del gen APOE determinadas por dos SNPs. [22]

Genotipo	rs429358	rs7412	Pronóstico
ApoE $\epsilon 2/ \epsilon 2$	T,T	T,T	Poco común. Posible protección.
ApoE $\epsilon 2/ \epsilon 3$	T,T	C,T	
ApoE $\epsilon 2/ \epsilon 4$	C,T	C,T	
ApoE $\epsilon 3/ \epsilon 3$	T,T	C,C	Más común.
ApoE $\epsilon 3/ \epsilon 4$	C,T	C,C	
ApoE $\epsilon 4/ \epsilon 4$	C,C	C,C	Variante de riesgo.

1.8. Discriminación alélica.

Los métodos actualmente usados, emplean cuatro mecanismos generales para llevar a cabo la discriminación alélica: hibridación alelo-específica, ligación de oligonucleótidos alelo-específicas, incorporación de oligonucleótidos alelo-específica y corte enzimático alelo-específico. Algunos ejemplos de estas técnicas son:

1.8.1. PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)

Se usan enzimas de restricción que cortan secuencias específicas de ADN; es decir, un fragmento de ADN amplificado por PCR se somete a digestión con una endonucleasa, ésta tendrá un sitio de corte específico y las variaciones alterarán este patrón de corte; dado como resultado un patrón diferente de migración que puede ser visualizado mediante el corrimiento de estos fragmentos en geles de agarosa, comparando y distinguiendo los distintos genotipos. [21]

Importantes ventajas de la técnica es que resulta barato y no se requieren instrumentos muy sofisticados o avanzados. Además, el análisis es generalmente fácil. Las desventajas son que se requieren endonucleasas específicas y la identificación exacta de la variación resulta difícil por el hecho de que varios SNPs son reconocidos por la misma enzima de restricción. [26].

1.8.2. Hibridación

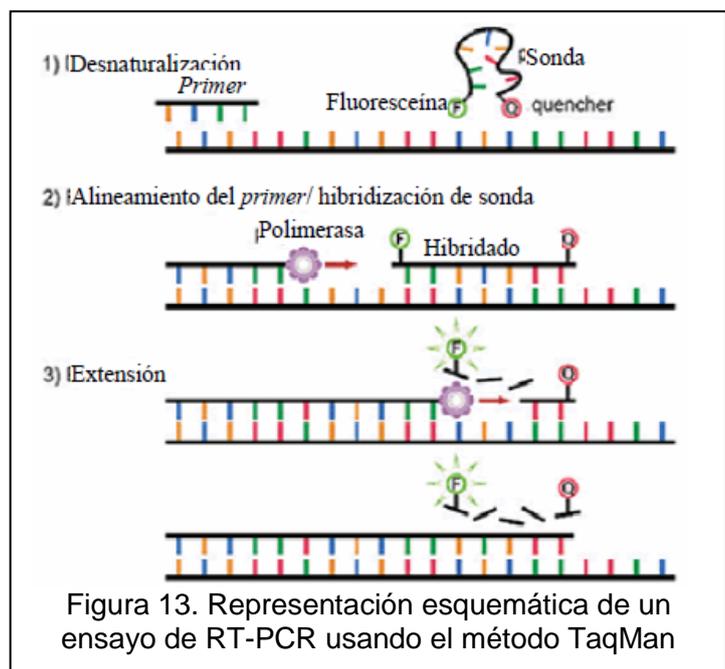
En ésta se diseñan dos pruebas alelo-específicas para hibridar a una secuencia blanco, solamente cuando éstas sean totalmente complementarias. Cuando las zonas alelo-específicas son inmovilizadas sobre un soporte, se capturan las muestras de ADN y se visualizan los eventos de hibridación detectando una marca fluorescente. La hibridación es una de las formas más fáciles para la discriminación alélica ya que no se usan enzimas.

1.8.3. PCR en tiempo real

Mediante la técnica de PCR es posible amplificar un segmento de ADN de manera exponencial, ya que después de cada ciclo se duplica la cantidad de ADN que existe si la reacción ocurre con máxima eficiencia.

La reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR) muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre. Este método utiliza sondas marcadas con dos tipos de fluoróforos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET⁵) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, conocidas comercialmente como Taqman, las sondas conocidas como molecular beacons, scorpions, y las sondas FRET. [27]

Las sondas de hidrólisis empleadas, son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin



embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 13).

La primera gran ventaja de la PCR a tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Además, gracias a su rapidez, estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja

⁵ Se presenta una interacción dependiente de la distancia entre los estados excitados de dos marcadores diferentes, en los cuales la excitación se transfiere de una molécula donadora a una molécula aceptora a distancias alrededor de 70-100Å sin la emisión de un fotón. Como resultado, la emisión del fluoróforo reportero es reprimida.

muy importante de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla y más precisa. Los equipos para PCR a tiempo real tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.[28]

1.9. Equilibrio de Hardy Weinberg

En 1908 Godfrey Hardy y Wilhelm Weinberg formularon independientemente una relación que puede ser empleada para predecir frecuencias alélicas según las frecuencias genotípicas, o la inversa, determinar frecuencias genotípicas según las frecuencias alélicas.

Esta relación se encuentra determinada por la fórmula:

$$p^2+2pq+q^2=1$$

Una población que se encuentra en equilibrio de Hardy- Weinberg presenta ciertas características: la especie es diploide, presenta reproducción sexual, las generaciones son discretas, hay panmixia, es decir, la unión de los gametos se produce al azar, el tamaño de la población es grande, no hay migración, no hay mutaciones o su probabilidad es baja y no se ve afectada por selección natural. Mientras estas características se cumplan los valores de frecuencias alélicas se mantendrán a lo largo de las generaciones.

Desviaciones de equilibrio de Hardy y Weinberg pueden deberse a selección, migración, subdivisión poblacional no detectada o simplemente error en el muestreo.

El efecto Wahlund consiste en que la población muestreada presenta un exceso de homocigotos. Debido a que en ciertas ocasiones es difícil determinar los límites entre una población y otra, al momento de realizar el muestreo, individuos de dos poblaciones diferentes son clasificados como una sola. Si las dos poblaciones presentan frecuencias alélicas diferentes se observará una mayor proporción de individuos homocigotos lo que podría llevar a asumir que la población no se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg. [29]

En un estudio de asociación es necesario verificar que los SNPs genotipados se encuentran en equilibrio HW, ya que desviaciones de este equilibrio pueden ser indicativas de errores de genotipado o bien de la existencia de factores que podrían afectar a las frecuencias alélicas (por ejemplo, migración reciente) diferentes del rasgo de estudio. Si no se examina puede dar lugar a asociaciones espurias. [20]

1.10. Estructura genética de las poblaciones

Las frecuencias alélicas, o sea la proporción de cada uno de los alelos en un gene dado generalmente son diferentes entre las poblaciones que forman a una especie y esto, constituye la estructura genética de las poblaciones.

Cuando hablamos de una especie con alta estructura genética, nos referimos a que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. En contraste, en una especie con baja estructura genética, las poblaciones que la constituyen son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas.

Las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones son consecuencia de las acciones de las fuerzas evolutivas a lo largo del tiempo, y por eso funcionan como un archivo de la historia evolutiva de las poblaciones. La selección natural, al adaptar a cada una de las poblaciones a sus condiciones locales, generalmente va a aumentar la diferenciación, siempre y cuando las condiciones sean diferentes en cada localidad y el gen que se estudia tenga que ver con esta adaptación. La deriva génica es un proceso azaroso que siempre produce que se diferencien (que diverjan) las diferentes poblaciones de una especie y va a ser más importante entre más pequeñas sean las poblaciones. La mutación también incrementa la diferenciación genética, pero debido a que usualmente las tasas de mutación son muy bajas, su papel en generar diferenciación dentro de una especie es mínimo. Caso contrario, el flujo génico, también llamado migración, al mover genes entre las poblaciones que forma a una especie evita que diverjan al homogenizar las frecuencias alélicas.

El flujo génico es la violación al supuesto del equilibrio de Hardy-Weinberg que se refiere al "aislamiento" de la población. Formalmente, el flujo génico se define como la incorporación de genes a una poza génica provenientes de una o más poblaciones diferentes dentro de una especie.[30]

1.10.1. Estimaciones de endogamia: Fis

La Fis describe la distribución de los genotipos dentro de las poblaciones, y nos indica qué tan lejos se encuentra una población del equilibrio de Hardy Weinberg (Las frecuencias de genotipos que se obtendrían si los apareamientos son al azar). La Fis es de 0 si las poblaciones se encuentran en las proporciones esperadas, si los apareamientos fueran estrictamente al azar, y puede llegar hasta 1 si sólo se encuentran individuos homocigotos en la población (lo cual generalmente es una consecuencia de la endogamia extrema). Si la Fis es negativa, quiere decir que se tiene un exceso de heterocigotos.[30]

1.11. Población Mexicana

La población mexicana se divide en dos grupos, principalmente: Mestizos e indígenas (Amerindios). Los mestizos surgieron por la mezcla entre Europeos, Amerindios y esclavos Africanos durante y después de la conquista del nuevo mundo.

La población Mestiza forma la mayor parte de la población mexicana ($\approx 93\%$), mientras que el tanto restante está conformado por los grupos étnicos del País.

La población indígena posee alrededor de 6.7 millones de individuos, en la cual se incluyen más de 68 grupos étnicos y más de 85 dialectos diferentes.

Muchos de los grupos nativos ocupan gran extensión geográfica de la Sierra Madre (figura 14), principalmente en las regiones centro, sur y sureste de México.

Esta área concentra gran diversidad étnica posiblemente por el limitado flujo génico entre el norte y sur de América tiempos prehistóricos.

En la actualidad, los grupos amerindios habitan comunidades aisladas con un tamaño poblacional reducido. Algunas tribus, o parte de éstas, han conservado sus tradiciones, dialectos y religiones y han tenido una limitada mezcla con la población mestiza que les rodea.

El componente genético de los grupos amerindios ha sido reestructurado considerablemente en los últimos 500 años como resultado de diferentes procesos demográficos (cuellos de botella, efecto fundador y deriva génica). Por ejemplo, la llegada de los Europeos al Nuevo Mundo generó una disminución en la población nativa americana debido a las guerras, hambrunas y enfermedades; lo que ocasionó una disminución en la diversidad de estas poblaciones. Los grupos indígenas de México presentan una relativa heterogeneidad debido a los eventos demográficos ya descritos. [31]



Figura 14. Localización geográfica de la Sierra Madre en la República Mexicana.

2. Objetivos

- Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ del gen APOE en muestras poblacionales de los Estados de Hidalgo, Puebla, Querétaro y Estado de México.
- Determinar si las variantes alélicas del gen APOE, rs429358 y rs7412, se encuentran en Equilibrio de Hardy Weinberg.

3. Justificación

El gen APOE ha sido reconocido como uno de los factores genéticos que predispone a la Enfermedad de Alzheimer, es decir, la presencia de uno de los alelos de este gen ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) puede aumentar la probabilidad de presentar la EA o proteger contra dicha enfermedad. Para el caso del alelo $\epsilon 4$, poseer al menos una copia de este gen, localizado en el cromosoma 19, aumenta la probabilidad de padecer la enfermedad debido a su: poca eficiencia para evitar la hiperfosforilación de la proteína Tau, aumento en la degeneración neurofibrilar, menor plasticidad sináptica, incremento en los niveles basales de Ca^{2+} y poca efectividad en el transporte del colesterol al cerebro, componente necesario para mantener la integridad sináptica y función neuronal. Aunque existen evidencias de casos de pacientes con EA que no presentan dicho alelo, existen otros en los que sí se ha visto la existencia del alelo para la enfermedad.

Se han llevado a cabo muchos estudios descriptivos sobre estructuración genética del gen APOE en población mexicana, en los cuales, se determina la frecuencia alélica y genotípica de $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. Sin embargo, dichos estudios se han centrado en la parte sur y norte del país, sin contemplar, hasta el momento, la zona del Valle de México.

Investigaciones relacionados con la asociación del genotipo APOE con la Enfermedad de Alzheimer se han realizado en diferentes poblaciones del mundo, a pesar de ello, las asociaciones hechas hasta hace poco eran espurias debido a que no se consideraba la heterogeneidad de éstas (estratificación poblacional). Además, algunos de los estudios realizados eran únicamente de tipo de casos y controles, sin contemplar una población abierta que pudiera ofrecer un panorama real sobre la estructura genética de la población de estudio. Conocer la presencia de cualquiera de los tres alelos, ayudará a saber la probabilidad de riesgo o protección que tendría un individuo para el desarrollo de la enfermedad.

Es por eso que en el presente trabajo, se considera el estudio en una población abierta, donde, se eviten los sesgos ocasionados por dicha estratificación poblacional y cuyo objetivo sea identificar la frecuencia alélica de los polimorfismos del gen APOE de la población centro-Bajío de la Ciudad de México y con ello establecer una base que logre, en estudios futuros, mejores asociaciones de gen-enfermedad.

4. Materiales y Métodos

4.1. Población de estudio

El presente estudio incluye 300 individuos, 150 mujeres y 150 hombres, con un rango de edad entre 25 y 55 años, que acudieron a reconocimiento médico en el laboratorio BIMODI, Querétaro. Los datos recogidos han sido tratados confidencialmente de acuerdo a lo establecido en el Reglamento de la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares.

4.2. Genotipado de APOE

Debido a que las muestras, procedentes de sangre, ya venían extraídas por parte del laboratorio BIMODI, éstas fueron sólo cuantificadas mediante el nanodrop 200 ThermoFisher Scientific, y se llevaron a una concentración de 10 ng/uL. El material genético se envió ya extraído e identificado por parte del laboratorio BIMODI.

Los genotipos para los dos polimorfismos tipo SPN de APOE, rs429358 (C_3084793_20) y rs7412 (C_904973_10) (Applied Biosystems), fueron determinados por genotipificación TaqMan SNP, donde 2 µL de DNA genómico, de cada individuo, fue colocado en tubos low profile (Applied Biosystems) y diluido en una mezcla de reacción (volumen total 3.5 µL) que consistió en 0.75 µL de agua grado inyectable, 2.50 µL de qPCR Master Mix (KapaBiosystems) y 0.25 µL de sonda TaqMan. El Software CFX Manager fue usado para la genotipificación. El control positivo fue incluido en todos los ensayos de TaqMan-PCR.

El proceso de amplificación (termociclador Bio-Rad CFX96 Real-Time System, C1000) consistió en una desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 92°C por 15 segundos y alineamiento a 60°C por 1:30 minutos.

Para comprobar la reproducibilidad de los ensayos, el 10% las muestras fueron seleccionadas azarosamente y se duplicó el genotipificado de éstas.

4.3. Análisis estadístico

En el paquete multiplataforma (Análisis Genético en Excel) GenAIEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas.

El Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) fue estimado con Genetix v4.05., considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. La prueba de Fis se utilizó para verificar el Equilibrio de Hardy Weinberg y comparar frecuencias alélicas.

4.3.1. APOE análisis

El genotipo de APOE se compone de dos de los alelos $\epsilon 2$ (Protección), $\epsilon 3$ (neutro) y $\epsilon 4$ (riesgo). El genotipo de cada individuo fue determinado mediante la conversión del genotipo de los SNP hacia los seis genotipos convencionales de APOE (22, 23, 33, 34, 24 y 44).

5. Resultados y Discusión

Los 300 individuos de la población del Valle de México (Querétaro, Puebla, Hidalgo y Estado de México) (150 hombres y 150 mujeres) fueron genotipados para los polimorfismos rs7412 y rs4289358 (tabla 3). La población estuvo en equilibrio de Hardy Weinberg con un valor de p de 0.39 para el caso de los hombres y 0.69 para el caso de las mujeres. Dicho valor soporta el valor que el estadístico de FIS proporciona, comprobando que la población, en efecto, se encuentra en equilibrio. El valor de Fis fue de 0.028 para la población masculina y -0.026 para la población femenina, mostrando con ello un exceso de homocigotos y heterocigotos, respectivamente. Dicho suceso, de que la población se encuentre en Equilibrio de Hardy Weinberg, refiere a que en los últimos años no han existido eventos demográficos que intervengan en el cambio de las frecuencias alélicas y genotípicas, es decir, no ha habido migraciones, cuellos de botella, flujo génico, etc. que ocasionen cambio alguno entre las frecuencias observadas y las esperadas.

Las frecuencias genotípicas y alélicas (figuras 15 y 16, tabla 3) encontradas dentro de la población de estudio se acercan a las frecuencias esperadas. Dicha frecuencia se esperaba ubicar entre las frecuencias reportadas en las poblaciones caucásicas y poblaciones amerindias, siendo que nuestra población de estudio es una población Mestiza, mezcla de las anteriores.

La distribución genotípica (tabla 3) de APOE de las 150 muestras de individuos masculinos fueron 79% para $\epsilon 3 \epsilon 3$, 14.7% para $\epsilon 3 \epsilon 4$, 4.6% para $\epsilon 2 \epsilon 3$, 1% para $\epsilon 2 \epsilon 4$ y 0.7% para $\epsilon 2 \epsilon 2$ y ausencia del genotipo $\epsilon 4 \epsilon 4$. Respecto a las 150 muestras de mujeres, la distribución fue de 76% para $\epsilon 3 \epsilon 3$, 18% para $\epsilon 3 \epsilon 4$, 4.6% para $\epsilon 2 \epsilon 3$, 0.7% para $\epsilon 2 \epsilon 4$ y 0.7% para $\epsilon 4 \epsilon 4$ y ausencia del genotipo $\epsilon 2 \epsilon 2$.

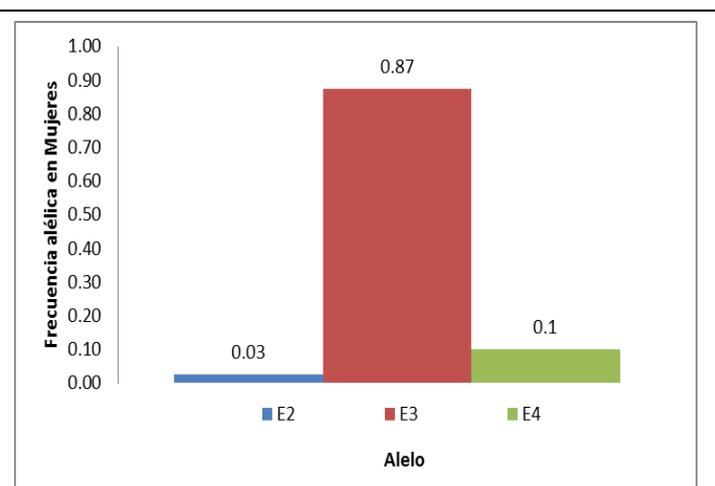
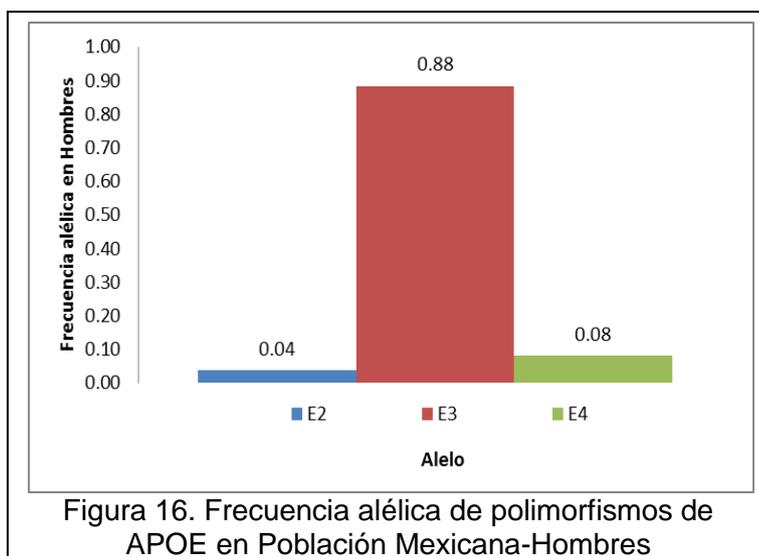


Figura 15. Frecuencia alélica de polimorfismos de APOE en Población Mexicana- Mujeres



De acuerdo al número de población femenina que presenta el genotipo $\epsilon 4 \epsilon 4$ (alelo de riesgo) respecto a la población masculina, no se puede asegurar que la presencia del alelo de riesgo se encuentre en mayor frecuencia en mujeres que en hombres, puesto que el evento se debe, posiblemente, al azar. Para concluir que posiblemente el genotipo de riesgo está implicado de acuerdo al género, sería necesario aumentar el

número de individuos de estudio para ambas poblaciones (mujeres y hombres), donde, si en la población femenina siguen existiendo mayor distribución genotípica $\epsilon 4 \epsilon 4$, el factor de riesgo quizá si podría estar relacionado con el sexo.

Además, una prueba realizada en la página OpenEpi (Kevin M. Sullivan, Universidad Emory), muestra que para aumentar el intervalo de confianza de los datos es necesario aumentar, también, el número de individuos que conforma la muestra, esto es, para los 150 individuos muestreados en cada una de las poblaciones se tiene un intervalo de confianza del 80% aproximadamente, para aumentar el intervalo, mínimo al 95%, es necesario que el tamaño de n sea de 384 individuos, mientras que para un intervalo del 99% es necesario 664 individuos.

Tabla 3. Distribución de genotipos (número de personas y porcentaje) de los polimorfismos estudiados y Equilibrio de Hardy Weinberg.

Gen	Variante	No. Secuencia	Genotipo	n	Frecuencia genotípica	Equilibrio de Hardy Weinberg	
HOMBRES (150 muestras)						Fis	P<0.05
APOE	C112R	rs429358	$\epsilon 2 \epsilon 2$	1	0.007	0.028	0.39
			$\epsilon 2 \epsilon 3$	7	0.046		
	$\epsilon 3 \epsilon 3$	118	0.79				
	$\epsilon 3 \epsilon 4$	22	0.147				
	$\epsilon 4 \epsilon 4$	0	0				
	$\epsilon 2 \epsilon 4$	2	0.01				
MUJERES (150 muestras)						Fis	P<0.05
APOE	C112R	rs429358	$\epsilon 2 \epsilon 2$	0	0	-0.026	0.69
			$\epsilon 2 \epsilon 3$	7	0.046		
	$\epsilon 3 \epsilon 3$	114	0.76				
	$\epsilon 3 \epsilon 4$	27	0.18				
	$\epsilon 4 \epsilon 4$	1	0.007				
	$\epsilon 2 \epsilon 4$	1	0.007				

Para la población femenina, los alelos de APOE fueron, respectivamente, de más a menos frecuente $\epsilon 3$ (87%), $\epsilon 4$ (10%) y $\epsilon 2$ (3%), mientras que para la población masculina fue $\epsilon 3$ (88%), $\epsilon 4$ (8%) y $\epsilon 2$ (4%), es decir, ambas poblaciones mostraron frecuencias alélicas similares.

La ausencia del polimorfismo $\epsilon 2$ prevalece mayoritariamente en las poblaciones amerindias y en menor grado en las poblaciones mestizas, mientras que en poblaciones Caucásicas, si existe presencia del alelo dentro de la población. La ausencia de este puede ser debido a que la población mestiza es la mezcla de la población nativa Americana (Amerindios) con Españoles y Africanos, por tanto, de ahí viene la diferencia en la frecuencia alélica entre las poblaciones o que la población de muestra fue muy pequeña en la mayoría de los estudios.

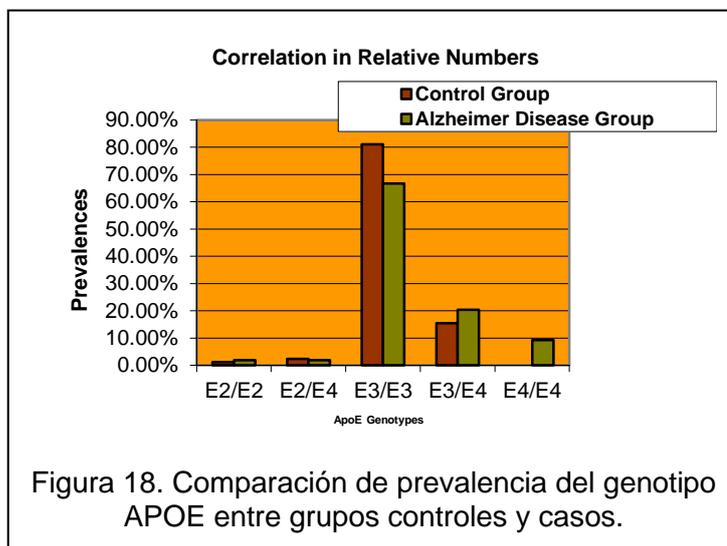
Respecto al alelo de riesgo, se ve claramente que existe un gran heterogeneidad entre las poblaciones Mexicanas, por lo cual se demuestra que nuestra población es subestructurada y que los estudios descriptivos de frecuencias alélicas y genotípicas son de gran ayuda para contemplar dicha heterogeneidad y hacer estudios verídicos de asociación gen- enfermedad (tabla 4).

Tabla 4. Distribución genotípica de APOE en diferentes poblaciones Mexicanas y del mundo.

Población	N	Genotipo de APOE						Referencia
		$\epsilon 2 \epsilon 2$	$\epsilon 2 \epsilon 3$	$\epsilon 3 \epsilon 3$	$\epsilon 3 \epsilon 4$	$\epsilon 4 \epsilon 4$	$\epsilon 2 \epsilon 4$	
Amerindios								
Huicholes, Nayarit	40	0	0	0.50	0.43	0.075	0	Aceves et. al. 2006
Mazatecos	75	0	0	0.813	0.173	0.013	0	Gamboa et. al. 2000
Mayas	135	0	0	0.82	0.18	0	0	Kamboh et. al. 1991
Mestizos								
Centro- Bajío Mujeres	150	0	0.046	0.76	0.18	0.007	0.007	Presente estudio
Centro- Bajío Hombres	150	0.007	0.046	0.79	0.147	0	0.001	Presente estudio
D.F.	83	0	0	0.83	0.168	0	0	Gamboa et. al. 2000
Nayarit	61	0	0.033	0.74	0.23	0	0	Aceves et. al. 2006
Sinaloa	83	0.01	0.06	0.634	0.239	0.02	0.037	Sánchez C. et. al. 2010
Durango	30	0	0	0.77	0.23	0	0	Aceves et. al. 2006
Guadalajara	179	0.011	0.11	0.72	0.13	0.005	0.028	Aceves et. al. 2006
Otras Poblaciones del mundo								
Zambia, Africa (Sur)	65	0	0.2	0.34	0.31	0.08	0.08	Masharip et. al. 2014
Pakistan (Sur Asia)	672	0.003	0.054	0.73	0.19	0.0119	0.009	Cheema et. al. 2015
España, Europa	4660	0.005	0.10	0.71	0.163	0.009	0.012	Tejedor et. al. 2014

Existe mayor similitud en las frecuencias genotípicas para las poblaciones de Guadalajara, Durango y la población de estudio del presente trabajo. Guadalajara actualmente es considerada

Se propone también hacer estudios de casos y controles y comparar si la prevalencia encontrada en esos estudios es mayor en los casos respecto a las poblaciones controles (población abierta-descriptivas) estudiadas hasta el momento, para con ello, determinar la asociación entre la apolipoproteína E genotipo $\epsilon 4$ con la enfermedad de Alzheimer en población Mexicana.



Además de que no hay datos en poblaciones Mexicanas con relación al genotipo ApoE en pacientes con Alzheimer [32], por lo que estudios de este tipo son útiles para la asociación del factor genético APOE con la Enfermedad de Alzheimer.

8. Bibliografía

- [1] J. P. Casanova, "Enfermedad de Alzheimer. Del diagnóstico a la terapia: conceptos y hechos." Fundación La Caixa, Barcelona, pp. 11–38, 1999.
- [2] R. Sánchez, "Los cerebros que podrían acabar con Alzheimer," *Septiembre, 2014*, 2014. [Online]. Available: <http://quo.mx/expediente/2014/09/20/los-cerebros-que-ayudaran-contral-alzheimer>. [Accessed: 08-May-2015].
- [3] O. M. de la Salud, "Demencia. Nota descriptiva 362.," *Marzo, 2015*. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>. [Accessed: 06-Apr-2015].
- [4] et. al. Saxena S., Wortmann M, *Demencia. Una prioridad de salud pública*, Dua T (OMS. Washington, D.C.: , 2013, pp. 2–93.
- [5] E. al. M. Prince, E. Albanese, "Dementia and Risk Reduction. An analysis of protective and modifiable factors," London, 2014.
- [6] H. Heike, "PREVALENCIA DE DEMENCIA EN POBLACIÓN GENERAL: UNA REVISIÓN," vol. 77, no. 1, pp. 29–34, 2009.
- [7] F. S., "Perfil Epidemiológico de la Salud Mental en México," México, 2012.

- [8] P. Antonio, K. Morales, L. Igor, and R. Valencia, "El Alzheimer en México. Epidemiología en breve," México, 2012.
- [9] P. Shuai, Y. Liu, W. Lu, Q. Liu, T. Li, and B. Gong, "Genetic associations of CLU rs9331888 polymorphism with Alzheimer's disease: A meta-analysis.," *Neuroscience letters*, vol. 30, no. 591, pp. 160–165, Mar. 2015.
- [10] E. A. y C. Juri, "Alfasinucleinopatías y Tauopatías: Una aproximación molecular a la clasificación de las enfermedades neurodegenerativas." Departamento de Neurología, Chile, 2007.
- [11] N. Setó-salvia and J. Clarimón, "Genética en la enfermedad de Alzheimer," *Revista de Neurología*, vol. 50, no. 6, pp. 360–364, 2010.
- [12] T. Kanekiyo, H. Xu, and G. Bu, "ApoE and A β in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners?," vol. 81, no. 4, pp. 740–754, Feb. 2014.
- [13] M. Fernández and J. Castro, "Marcadores genéticos en la enfermedad de Alzheimer : genes patógenos y de susceptibilidad," vol. 1, pp. 4–13, 2008.
- [14] C. R. De Sánchez, D. Nariño, J. Fernando, and M. Cerón, "Epidemiología y carga de la Enfermedad de Alzheimer," vol. 26, no. 3, pp. 87–94, 2010.
- [15] "Alzheimer's Disease and the Brain," *Alz.org*. [Online]. Available: https://www.alz.org/braintour/3_main_parts.asp. [Accessed: 19-Oct-2012].
- [16] et. al. J.L. Barronco, M.F. Allam, A.S. Del Castillo, "Risk factors for Alzheimer's disease.," *Revista de Neurología*, vol. 40, no. 10, pp. 613–618, 2005.
- [17] "ApoE y sus receptores en la enfermedad de Alzheimer.," *Agosto 2009*. [Online]. Available: <http://medmol.es/revisiones/59/>. [Accessed: 30-Mar-2015].
- [18] F. A. S. y A. A. A. Lamia F. Ab. Marrzoq, "Relationship between ApoE gene polymorphism and coronary heart disease in Gaza Strip.," *J Cardiovasc Dis Res*, vol. 2, no. 1, pp. 29–35, 2011.
- [19] R. E. F. M.I. Kamboh, K.M. Weiss, "APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico," *Clinical Genetics*, vol. 39, pp. 26–32, 1991.
- [20] S. M. Suárez C., Calle M., "Métodos de selección de variables en estudios de asociación genética . Aplicación a un estudio de genes candidatos en Enfermedad de Parkinson," 2011.
- [21] M. A. C. Caratachea, "Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones," *Agosto 2007*, vol. 20, no. 3, pp. 213–221, 2007.
- [22] SNPedia, "APOE," 26-Julio-2015. [Online]. Available: <http://www.snpedia.com/index.php/APOE>. [Accessed: 28-Oct-2015].
- [23] SNPedia, "Rs429358," 27 Septiembre de 2015. [Online]. Available: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs429358>. [Accessed: 28-Oct-2015].
- [24] SNPedia, "Rs7412," 27 de Seotiembre de 2015. [Online]. Available: <http://www.snpedia.com/index.php/Rs7412>. [Accessed: 28-Oct-2015].

- [25] D. H. Kim, S. H. Yeo, J.-M. Park, J. Y. Choi, T.-H. Lee, S. Y. Park, M. S. Ock, J. Eo, H.-S. Kim, and H.-J. Cha, "Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease.," *Gene*, vol. 545, no. 2, pp. 185–193, Jul. 2014.
- [26] B. R. Henrik, "Restriction Fragment Length polymorphism Analysis of PCR- Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis _Valuable tool for Genotyping and genetic fingerprinting," in *Principles and Basics*, 2012.
- [27] R. P. S. Silberman, *PCR en tiempo real*. México: IBT-UNAM, 2006, pp. 1–53.
- [28] J. Costa, "Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real," vol. 22, no. 5, pp. 299–305, 2004.
- [29] D. I., "Caracterización de nuevos marcadores genéticos Microsatélites e identificación de SNP en el gen de Trichialina en alpacas (*Vicugna pacos*)," Universidad Peruana, 2014.
- [30] L. E. Eguiarte, E. Aguirre-planter, E. Scheinvar, and A. González, "Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas.," México, 2010.
- [31] M. Sosa-Macías and A. Llerena, "Cytochrome P450 genetic polymorphisms of Mexican indigenous populations.," *Drug metabolism and drug interactions*, vol. 28, no. 4, pp. 193–208, Jan. 2013.
- [32] V. G. A., "Frecuencia del Genotipo ApoE E4 en Pacientes con la Enfermedad de Alzheimer en Monterrey, N.L. México." México, pp. 1–26.