



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE
LA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE) EN LA POBLACIÓN DE LA SIERRA
ECUATORIANA.

AUTOR

Joel Andrés Silva Sánchez

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE LA
APOLIPOPROTEÍNA E (APOE) EN LA POBLACIÓN DE LA SIERRA
ECUATORIANA.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor Guía

M.Sc. María Gabriela Granja Bastidas

Autor

Joel Andrés Silva Sánchez

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Gabriela Granja Bastidas

Máster en Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina: especialidad en
Patología Molecular.

C.C. 1712995149

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Andrea Paola Cordero Arroyo
Máster en Células Madre y Medicina Regenerativa
C.C. 1714664825

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndolo con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”

Jennyfer Maribel García Cárdenas
Máster en Genética Molecular y Diagnóstico.
C.C. 1716947815

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Joel Andrés Silva Sánchez

C.C. 1104347859

AGRADECIMIENTO

A toda mi familia por apoyarme a cumplir todas mis metas. Agradezco a todos mis amigos que estuvieron ahí en los momentos más difíciles, en especial a Patricia y Mayra quienes siempre me ayudaron cuando más necesitaba. Un agradecimiento a Jennyfer García por confiar en mí, brindarme su amistad y guiarme a lo largo del desarrollo de esta investigación. Gracias al Instituto de Investigaciones Biomédicas por brindarme todas las facilidades para desarrollar mi proyecto. Así como a todos sus investigadores por instruirme y ayudarme a crecer profesionalmente. Gracias a la profesora Gabriela Granja por ayudarme a la culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi abuelitos por todo su amor. A mi mamá y papá por todo el esfuerzo que hicieron para permitirme cumplir este sueño y por ayudarme a levantarme luego de cada tropiezo. A mis hermanos que siempre confiaron y creyeron en mí.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia más común a nivel mundial presente en personas de edad avanzada, en Ecuador cerca del 70% de los casos de demencia corresponden a este padecimiento. Puede ser causada por diversos factores pero principalmente se debe al envejecimiento y a variaciones del gen *apoE*. El cual presenta tres alelos distintos (E2, E3, E4) que darán origen a seis genotipos diferentes, mismos que codifican la apolipoproteína E (APOE). Dependiendo el genotipo, APOE regulará de distinta manera los lípidos, en el cerebro su funcionamiento irregular puede causar distintas patologías demenciales, principalmente el Alzheimer. En el presente estudio, se determinó la frecuencia genotípica y alélica del gen *ApoE* en la población de la sierra ecuatoriana. Para lo cual se estableció una muestra poblacional de 110 individuos con edades avanzadas, conformados por un grupo de pacientes afectados con Alzheimer y un grupo control sin la enfermedad. Se utilizaron distintas técnicas de biología molecular para determinar el genotipo que posee cada individuo. Mediante pruebas estadísticas, se analizó las diferentes frecuencias genotípicas y alélicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer en población de estudio. Se observó que existe una mayor frecuencia de del genotipo E3/E3 en ambos grupos, lo que indica que no se encuentra asociado a la patología. De igual forma, se encontró que el alelo E3 es el más frecuente mientras que E2 fue el menos observado. También se observó que los mayores factores de riesgo son los alelos E2 y E4, por lo que los individuos de población de la sierra ecuatoriana que los posean, podrían ser más susceptibles a desarrollar Alzheimer.

Palabras clave: gen *apoE*; Alzheimer; apolipoproteína E.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most common type of dementia worldwide found in older people, in Ecuador about 70% of people with dementia suffer from it. It can be caused by various factors but is mainly due to aging and variations of the *apoE* gene. It presents three alleles (E2, E3, E4) that will give rise to six different genotypes, which code for apolipoprotein E (APOE). Depending on the genotype, APOE will regulate the lipids differently, in the brain its irregular functioning can cause different dementia pathologies, mainly Alzheimer. In the present study, the genotypic and allelic frequency of the *apoE* gene was determined in the population of the Ecuadorian sierra. For this study was established a population sample of 110 individuals with advanced ages, conformed by a group of Alzheimer's patients and a control group without the disease. Different molecular biology techniques were used to determine the genotype presented by each individual. Statistical tests were used to analyze the different genotypic and allelic frequencies associated with Alzheimer's disease in the study population. It was observed that there is a greater frequency of the E3/E3 genotype in both groups, indicating that it is not associated to the pathology. Similarly, the E3 allele was found to be the most frequent while E2 was the least observed. It was also observed that the major risk factors are the E2 and E4 alleles, so that individuals from the population of the Ecuadorian sierra who own them may be more susceptible to Alzheimer's disease.

Keywords: *apoE* gene; Alzheimer; Apolipoprotein E.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Justificación	5
2. Marco teórico	7
2.1 La demencia	7
2.2 Demencia tipo Alzheimer	8
2.2.1 Síntomas.....	9
2.2.2 Neuropatología	10
2.3 Diagnóstico	10
2.4 Causas de la Enfermedad de Alzheimer	11
2.4.1 Proteínas β -amiloide (A β).....	12
2.4.2 Proteínas Tau	13
2.4.3 Interacción A β -amiloide y Tau	14
2.5 Clasificación de la enfermedad de Alzheimer.....	15
2.5.1 Enfermedad de Alzheimer de aparición temprana.....	15
2.5.2 Enfermedad de Alzheimer de aparición tardía.....	16
2.6 Apolipoproteína E	17
2.6.1 APOE4.....	18
2.7 Polimorfismos asociados con la enfermedad de Alzheimer....	20

2.7.1 Métodos de detección de los polimorfismos de <i>apoE</i>	21
3. Diseño del plan experimental	22
4. Procedimientos	23
4.1 Población y muestra	24
4.1.1 Selección de individuos	24
4.1.2 Obtención de la muestra biológica.....	24
4.2 Materiales y métodos	25
4.2.1 Extracción de ADN genómico a partir de sangre venosa.....	25
4.2.2 Análisis cualitativo del ADN	26
4.2.3 Análisis cuantitativo del ADN	26
4.2.4 Determinación del genotipo	27
4.2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
4.2.4.2 Restricción enzimática	29
4.2.5 Secuenciación tipo Sanger	30
4.2.5.1 Purificación de los productos de PCR mediante Ampure	30
4.2.5.2 PCR de secuenciación.....	31
4.2.5.3 Purificación de la PCR de secuencia mediante Cleanseq®	32
4.2.5.4 Secuenciación mediante electroforesis capilar	32
4.3 Evaluación estadística de los datos.....	33
4.3.1 Procesamiento estadístico de los resultados con el paquete GraphPad	33
4.3.2 Análisis de la estructura poblacional con el programa STRUCTURE.....	34
4.3.3 Análisis con el programa Genepop.....	34
5. Resultados y Discusión	35

5.1 Análisis de las edades de los individuos involucrados en el estudio	35
5.1.1 Distribución de la muestra poblacional de los pacientes y los controles negativos	36
5.2 Evaluación del ADN	39
5.3 Amplificación del gen <i>apoE</i>	40
5.4 Determinación del genotipo	41
5.4.1 Restricción enzimática (RFLPs).....	41
5.4.2 Secuenciación automática del ADN por el método de Sanger	43
5.4.3 Análisis de los cambios de la estructura a nivel de la cadena polipeptídica.....	44
5.4.4 Distribución y frecuencia de los genotipos de la Apolipoproteína E	44
5.5 Análisis de la frecuencia alélica	50
5.5.1 Análisis del riesgo de cada alelo del gen <i>apoE</i>	54
6. Conclusiones y Recomendaciones.....	57
6.1 Conclusiones.....	57
6.2 Recomendaciones	58
Referencias.....	59
Anexos	69

1. Introducción

1.1 Antecedentes

La enfermedad de Alzheimer (EA) constituye el tipo de demencia más común a nivel mundial, representando del 60% al 80% de los casos. Este trastorno es uno de los principales responsables de la dependencia, incapacidad y mortalidad de las personas de edad avanzada. Según el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la tasa de incidencia de la EA, surgen 7,7 millones de casos de demencia en todo el mundo cada año, lo que implica un nuevo caso cada 4 segundos (Sosa, Acosta y Prince, 2012, p. 2). A medida que la esperanza de vida aumenta, la población de edad avanzada se agranda y a su vez, las enfermedades de aparición tardía se incrementan como es el caso del Alzheimer, derivado principalmente de los bajos niveles de educación, las altas tasas de lesión cerebral, la mala alimentación, el tabaquismo, el estilo de vida sedentario, etc (Rizzi, Rosset y Roriz, 2014, p. 5).

En la EA como en el resto de demencias, existe un alto porcentaje de células nerviosas que se deterioran conforme avanza el tiempo y mueren poco a poco. Un cerebro sano posee 100 mil millones de neuronas conectadas entre sí, que transmiten y procesan toda la información, recuerdos, pensamientos y habilidades. En este padecimiento, dicha transferencia se reduce dramáticamente debido a que las neuronas van muriendo. Aunque aún no se entiende completamente el proceso que conlleva al gran daño que sufre el cerebro, se sabe de la existencia de proteínas como las β -amiloide y las Tau que en exceso provocan el bloqueo y muerte de las neuronas (Alzheimer Association, 2008).

Hay diversas causas para la manifestación del Alzheimer, se clasifican según su genética y edad de inicio, pero todas son difícilmente distinguibles desde un punto de vista clínico. Puesto que la mayoría son casos de aparición tardía

(alrededor del 75%), no cabe duda que existen varios polimorfismos que juegan un papel importante en la patología de la enfermedad. Hasta el momento se han identificado 2973 nuevos Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP por sus siglas en inglés) en 695 genes que actúan modificando la susceptibilidad. No obstante, en 1993, *apoE4* se identificó como el factor de riesgo genético más importante en el desarrollo de la enfermedad y desde entonces se han realizado varios estudios en diversas regiones alrededor del mundo con el fin de reconocer la frecuencia y el riesgo que cada población presenta a causa del gen y su interacción con el medio ambiente (Paz-y-Miño y García, 2015, pp. 5-6).

Las variantes alélicas del gen de la apolipoproteína E (APOE) se han asociado ampliamente con el Alzheimer, razón por la cual han sido objeto de mucha investigación y de debate. También se encuentra relacionado con otros tipos de demencias, tal es su impacto que varios estudios están orientados a descubrir las diferentes variables presentes en cada región que interactúan con los polimorfismos de *apoE* como factores de riesgo (Molero, Pino y Maestre, 2001, p. 4).

La edad es el mayor factor de riesgo en la incidencia del Alzheimer, incrementándose casi al doble cada 5 o 6 años a partir de los 65 años, siendo mucho peor para aquellas personas que heredan el alelo E4 que incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad. Existen otros genes que también se encuentran relacionados con un mayor riesgo, los cuales están acoplados con el procesamiento de proteínas, transporte de lípidos, función sináptica, respuesta inmune, inflamación y demás procesos fisiológicos involucrados dentro de la patogénesis de la enfermedad. La influencia genética se ve claramente reflejada en aquellas personas que tienen un padre o hermano afectados, siendo más propensos a desarrollar Alzheimer de inicio temprano (Sibener et al., 2014, pp. 106-108).

En la mayoría de publicaciones, se atribuye al bajo nivel educacional el incremento del riesgo del deterioro cognitivo y subsecuentemente con la

demencia, ya que se cree que aquellas personas con mayor nivel de educación pueden mostrar un mejor rendimiento en pruebas cognitivas. Se relaciona también con otros factores como el nivel socioeconómico, coeficiente intelectual, nutrición y estilo de vida; es decir la educación a largo plazo puede inducir una neuroprotección (Rodríguez y Gutiérrez, 2014, p. 380).

La Asociación de Alzheimer es la más grande fundación sin fines de lucro que se ha encargado de proveer fondos para la investigación del padecimiento. Cuenta con diversos socios a nivel mundial, con quienes han invertido \$335 millones en 30 países y actualmente, están financiando 400 proyectos con más de \$84 millones en países latinoamericanos, todo ello con el fin avanzar en la investigación de la demencia (Snyder et al., 2016, p. 751).

1.2 Planteamiento del problema

En 2010 se estimó que la prevalencia de la demencia es del 4,7% en personas mayores de 60 años de todo el mundo, mientras que para cada región se calcula un 2,6% en África, 4% en Asia, un 6,2% en Europa y 6,9% en América del Norte; es decir que existen cerca de 35 millones de personas que padecen demencia. Se espera que para el 2030 dicha cifra se duplique y para el 2050 llegue a 115.4 millones de casos. En las regiones más desarrolladas de América del Norte y Europa, la prevalencia será menor en relación a las menos desarrolladas como América Latina, donde se espera que dicha cifra crezca de manera exponencial a causa de la relación que tiene la EA con la edad (Sosa et al., 2012, p. 6).

En el continente americano la mayoría de los estudios sobre la EA, se han realizado en Estados Unidos y en países como Cuba, República Dominicana, Jamaica, Perú, Venezuela, México, Chile y Brasil. Todos ellos basados en la prevalencia de la demencia en personas mayores de 60 años. De esta manera, se ha encontrado que la prevalencia en América Latina y el Caribe es muy alta. Se estima que para el 2020, Cuba tendrá la población más numerosa de adultos

mayores de 60 años en toda América Latina, llegando a representar el 21,6% de la población total. De igual forma, se espera un notable incremento en el resto de países latinoamericanos (Paz-y-Miño y García, 2015, pp. 6-7).

En Ecuador en el 2013 se calculó que existían cerca de 74.000 personas con demencia, de las cuales el 70% eran casos de Alzheimer, según datos de la Alzheimer's Disease International. Para el 2015 la Fundación TASE estimó que en el país el número de casos crecería de 80 mil a 100 mil (TASE, 2015). A pesar del alto porcentaje de demencia y Alzheimer que existe en el país, hasta el momento, son escasos los datos sobre prevalencia, incidencia y factores de riesgo de la enfermedad. A nivel mundial existen varias investigaciones pero la información corresponde a poblaciones distintas a la ecuatoriana con realidades genéticas y ambientales diferentes (nutrición, educación, etnicidad, etc.) (Espinosa del Pozo et al., 2012, p. 51).

En los últimos años, las herramientas de genotipado han avanzado considerablemente, permitiendo un análisis más completo del genoma y en el caso del Alzheimer, han permitido darle un análisis cualitativo a profundidad. Sin embargo, aún se desconoce mucho sobre la estructura genética de la enfermedad. Problema que enfrentan principalmente los países menos desarrollados, donde los médicos no poseen herramientas que les permitan dar un diagnóstico más eficaz y rápido de la enfermedad. Los exámenes con los que cuentan, se basan en evaluar la memoria, a través de una serie de pruebas que buscan establecer el nivel cognitivo de los pacientes (Carmona, 2012, p. 3). Así los médicos tienen una idea general de la capacidad mental de las personas que sufren de la EA pero no saben a cabalidad lo que realmente les sucede, ya que la sintomatología de las enfermedades mentales se parece. Por lo cual, el diagnóstico se vuelve probabilístico y la única manera en que se comprueba a cabalidad la enfermedad, es en los estudios *post-mortem* del tejido cerebral. Además, en las etapas iniciales de la enfermedad, difícilmente se puede encontrar evidencias en los exámenes del líquido cefalorraquídeo o en las neuroimágenes (aplicados comúnmente cuando se trata de enfermedades

neurológicas), que permitan un diagnóstico certero. De esta manera, la enfermedad pasa desapercibida durante varios años, hasta que los trastornos se agravan y afectan a la vida cotidiana de las personas, en este punto es donde recién se da un diagnóstico fehaciente para iniciar el tratamiento paleativo (Allegri, 2010, p. 122).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia de los polimorfismos de la apolipoproteína E (APOE) en la población de la sierra ecuatoriana.

1.3.2 Objetivos específicos

- Genotipar a la población ecuatoriana para el gen *apoE* mediante PCR-RFLPs.
- Identificar la frecuencia alélica de los genotipos de *apoE* presentes en la población ecuatoriana mediante un análisis estadístico.

1.4 Justificación

El presente proyecto busca establecer una mejor comprensión de la genética del Alzheimer, pues sería de gran utilidad en diversos campos como: el diagnóstico, farmacogenómica y en la elaboración de planes de prevención para aquellas poblaciones que presenten un alto riesgo. Padecimientos como la EA, con una gran diversidad genómica, hacen necesario el conocer y entender los diferentes genotipos y asociaciones alélicas existentes en la misma, tanto entre el amplio

número de pacientes, como entre las diferentes poblaciones, cuyas diferencias genéticas dificultan que una única estrategia terapéutica sea eficaz.

Por tal motivo, es importante buscar nuevas alternativas como por ejemplo de farmacodinámica para establecer tratamientos más seguros para cada individuo. Una manera de hacerlo, es buscar un mejor entendimiento de las variantes alélicas del Alzheimer, las cuales pueden determinar perfiles genotípicos distintos que varían según la edad de comienzo, grado de deterioro cognitivo, perfusión cerebrovascular, grado de atrofia cerebral y principalmente de la expresión de la apolipoproteína E (Cacabelos, 2001, p. 216).

La genotipificación del gen *apoE*, es una alternativa que se puede utilizar para establecer la susceptibilidad en pacientes asintomáticos pero no elimina totalmente el riesgo a desarrollar la patología, debido a que no es el único gen asociado con la enfermedad. Por ello, la importancia de genotipar este y otros genes que signifiquen algún riesgo para la población. En ese sentido, este proyecto permitirá reforzar el diagnóstico, permitiendo una mejor valoración clínica para tratar de establecer un tratamiento más efectivo. Gracias a que se contribuye con información del genotipo, que resulta de gran importancia para pacientes que ya presentan deterioro cognitivo y el resto de síntomas.

Finalmente, el genotipado será importante para establecer la incidencia y prevalencia de la enfermedad de acuerdo a cada variante alélica y así, saber las repercusiones negativas que pueda tener a futuro en la población. En el caso de la población ecuatoriana, donde los datos son escasos y estudios como el presente, contribuyen a entender de mejor manera el comportamiento que pueda tener EA en esta región.

2. Marco teórico

2.1 La demencia

La demencia es un síndrome que afecta progresivamente las capacidades cognitivas de las personas, tales como el lenguaje, razonamiento, memoria, la toma de decisiones, atención y orientación. Generalmente, estos trastornos vienen acompañados de cambios de personalidad, desequilibrio emocional y alteración del comportamiento social; que a su vez, interfieren en el trabajo, en las actividades cotidianas (como ir de compras, finanzas, aseo personal, etc.), y en las relaciones sociales de cada persona, debido a que poco a poco la función intelectual se deteriora (Korolev, 2014, p. 25). Principalmente, afecta a las personas de edad avanzada pero se estima que del 2 a 10% de los casos pueden comenzar tempranamente, es decir antes de los 65 años de edad. Además, se conoce que posteriormente la prevalencia de la enfermedad se duplica cada cinco años, transformando a la demencia en una de las causas de discapacidad y dependencia de los adultos mayores de todo el mundo (Hendrix et al., 2015, p. 853).

Puede ser reversible o irreversible dependiendo de la gravedad del deterioro cognitivo y del tipo de demencia. Las demencias se pueden diferenciar en corticales como es el caso de la frontoparietal y el Alzheimer, o en subcorticales que afectan las estructuras localizadas bajo la corteza cerebral, como es el caso de la enfermedad cerebrovascular, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Wilson y la parálisis supranuclear progresiva. La demencia puede ser reversible si se debe al hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B12 o a la hidrocefalia de presión normal, mientras que se vuelve irreversible si se trata del Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular, demencia fronto-temporal, demencia de Wernicke-Korsakoff o al Parkinson, siendo el EA la enfermedad demencial más común (Bassil, 2012, p. 193).

2.2 Demencia tipo Alzheimer

El Dr. Alois Alzheimer en 1906, fue el primero en describir la aglomeración patológica de ciertas anomalías presentes en la autopsia del cerebro de una mujer que se vio afectada por varios años de problemas de memoria, disfunción del lenguaje y confusión. Observó la presencia de una serie de depósitos o placas densas en las neuronas y de bandas de fibras que las rodeaban. Factores que más tarde se reconocerían como las principales características de la enfermedad de Alzheimer (Bassil, 2012, p. 192).

La demencia tipo Alzheimer es el trastorno neurodegenerativo más común a nivel mundial, representando del 60 al 80% de los casos de demencia en personas de edad avanzada, sobre todo en aquellos que sobrepasan los 65 años. Conduce a un deterioro cognitivo progresivo que disminuye la capacidad mental, funcional, conductual, lingüística y de aprender. Inicialmente, los síntomas son leves pero gradualmente se genera un daño cerebral severo. Dependiendo de cada persona, la lesión se da a diferentes velocidades siendo más común en las mujeres. No hay tratamientos que permitan detener o revertir la progresión de la enfermedad, por lo cual empeora y finaliza con la muerte. La supervivencia media es de 7 años desde las etapas iniciales pero puede variar de acuerdo a la edad y sexo del paciente (Duthey, 2013, p. 10).

Actualmente, la EA es causante de más de 100.000 muertes al año en todo el mundo y se espera que la prevalencia aumente considerablemente en las próximas décadas, debido al crecimiento continuo de la población tanto en países desarrollados como aquellos que aún se encuentran en vías de desarrollo. Según la OMS para el 2025 la mayor prevalencia de la enfermedad, se situará en países de América Latina y Asia, mientras que las tasas serán bajas en India y Sudáfrica. En el 2050 se espera que haya un caso nuevo de EA cada 33 segundos y que la prevalencia anual aumente a 13.8 millones (Aprahamian, Stella y Forlenza, 2013, p. 451).

2.2.1 Síntomas

Los síntomas varían entre cada individuo pero el padecimiento que llevan en común todas las personas afectadas, es la dificultad gradual para recordar información nueva. Esta disminución de la memoria, es causada por el mal funcionamiento y muerte de las neuronas, provocando el deterioro cognitivo del cerebro. De esta manera, la capacidad para recordar nuevos acontecimientos de los individuos se ve seriamente afectada (Alzheimer's Association, 2015).

Los principales síntomas que se presentan en el Alzheimer son:

- dificultad para recordar cosas y actividades de la vida cotidiana.
- inconvenientes para resolver problemas o planificar actividades.
- problemas para completar las tareas básicas del hogar.
- confusión con los lugares y el tiempo.
- dificultad para relacionar las imágenes visuales y espaciales.
- problemas con las palabras, tanto para escribirlas como para pronunciarlas.
- disminución o falta de juicio.
- cambios de personalidad y el humor (incluyendo la depresión y apatía).

Conforme la enfermedad avanza las personas pierden poco a poco sus habilidades funcionales y cognitivas, por lo que necesitan ayuda con las actividades básicas como comer, bañarse e ir al baño. Además, no reconocen o se comunican con sus seres queridos; es decir se transforman en personas dependientes que requieren de cuidados especiales, al no poder valerse por sí mismos para poder subsistir. Asimismo, los individuos son más vulnerables a infecciones y en especial a la neumonía, principal factor que contribuye a la muerte de los pacientes (Alzheimer's Association, 2015).

2.2.2 Neuropatología

La neuropatología está relacionada con la lesión y muerte de las neuronas, en aquellas regiones del cerebro que intervienen en la capacidad de memoria y aprendizaje, hasta que se atrofia todo el cerebro (Duthey, 2013, p. 11). La degradación de las neuronas se puede extender a lo largo de la corteza temporal y de las zonas parietales, hasta finalmente afectar el neocórtex. Además, se ven afectados varios componentes del sistema límbico, incluido la formación del hipocampo y de los principales tractos de fibras que conectan con la corteza cerebral, el tálamo y la amígdala. Este tipo de neurodegeneración afecta las regiones límbicas y neocorticales, relacionadas con los déficits cognitivos y alteraciones en el comportamiento que presentan los pacientes con EA (Korolev, 2014, p. 26). Dependiendo la edad, el cerebro muestra un grado de atrofia en la porción medial del lóbulo temporal, el cual suele ser desproporcionado en relación con las demás áreas de la corteza (Zhang, Chang, Chu y Mak, 2012, p. 387).

2.3 Diagnóstico

El diagnóstico es del 75 al 90% correcto, donde los neurólogos especializados en la memoria pueden ser más precisos pero debido a la edad avanzada de la mayoría de los pacientes la precisión disminuye, principalmente los diferentes tipos de demencia que pueden padecer. Se trata de identificar el grado de atrofia del cerebro, aspecto que puede estar ligado a la edad de la persona, haciendo que un examen macroscópico sea difícil, por lo que se incluyen datos adicionales del paciente como: antecedentes familiares, enfermedades previas, nivel de educación, síntomas de disfunción cognitiva, síntomas conductuales, problemas psicológicos y sociales. Asimismo, se puede valorar la EA con tests que evalúan las funciones cognitivas y conductuales de las personas, los más utilizados son el test *Mini Mental State Examination* (MMSE) y la *Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale* (ADAS-cog). La herramienta más utilizada es el MMSE, el cual es un cuestionario acerca de la orientación espacial

y temporal, lenguaje oral y escrito, cálculo seriado, atención y copia de un dibujo; sin embargo, presenta problemas ya que su certeza se ve afectada por la edad y nivel educativo del individuo (CADIME, 2014).

A pesar que los tests pueden señalar cierto nivel de atrofia del cerebro, no indican con claridad lo que pasa en su interior, ya que a nivel microscópico se puede observar la pérdida neuronal a causa de las placas amiloideas y ovillos neurofibrilares. Por tanto, para tener un mejor diagnóstico de la EA se realizan estudios con resonancia magnética y así medir el nivel de atrofia del córtex derivada de la pérdida neuronal. También están las imágenes por emisión de positrones (PET), utilizadas para medir la carga del péptido amiloideo en el cerebro mediante imágenes computarizadas que pueden indicar el nivel de neurodegeneración. Sin embargo, estas técnicas aún tienen una limitación importante para un diagnóstico precoz, puesto que requieren de una pérdida neuronal considerable para que el daño sea visible en las neuroimágenes (Carrillo et al., 2013, p. 14 y Mart, 2009, p. 35).

Otra herramienta utilizada para el diagnóstico de la EA es el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR), para lo cual se realiza una punción lumbar (procedimiento clásico en neurología) para tratar de establecer los niveles de la proteína β -amiloide, pero no resulta tan útil porque se puede confundir con otras formas de demencia. Hasta ahora, la única manera de tener total certeza de que una persona sufre de la EA, es mediante un análisis histológico del tejido cerebral del individuo tras su muerte (Mart, 2009, p. 37).

2.4 Causas de la Enfermedad de Alzheimer

Al igual que otras enfermedades, la EA puede ser causada por diversos factores como son la aceleración del envejecimiento, exposición a ciertos factores medio ambientales (lesiones de cabeza, malnutrición, etc.), factores genéticos (mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, *apoE*, etc), factores vasculares

que comprometen al cerebro, disminución del sistema inmune y a agentes infecciosos (Armstrong, 2013, p. 6).

El Alzheimer puede desencadenar degeneración de las células nerviosas, debido principalmente a los agregados formados en las neuronas tanto de las proteínas β -amiloides, como de las proteínas Tau. Estas proteínas interfieren entre la sinapsis y en el transporte de nutrientes de las neuronas, provocando su muerte y desencadenando toda la sintomatología (Alzheimer's Association, 2015).

2.4.1 Proteínas β -amiloide (A β)

Las proteínas β -amiloide son amino péptidos ácidos constituidos de 39 a 42 residuos de aminoácidos y son producidos por la acción enzimática secuencial de la β -secretasa y γ -secretasa (*Figura 1*). El denominado péptido A β es el principal componente de los depósitos amiloides y se genera por la proteólisis limitada de la *Amyloid Precursor Protein* (proteína APP), una proteína transmembrana. El más abundante es el A β 40, pero el que tiene mayor potencial para la oligomerización, fibrilación y agregación es el A β 42. Estos péptidos se depositan poco a poco de manera extracelular en el cerebro formando las placas seniles, responsables de producir la neuroinflamación característica de la EA. El péptido A β produce agregaciones de oligómeros y fibrillas en el cerebro, siendo el principal elemento patológico. Aunque aún no se comprende por completo las características patológicas de la EA, se atribuyen varios mecanismos neuroquímicos, biológicos, genéticos, bioquímicos, entre otros (Kumar, Singh y Ekavali, 2015, pp. 8-9).

Los cambios estructurales y bioquímicos multifacéticos que se dan alrededor de los axones, las dendritas y los cuerpos celulares neuronales influyen en la pérdida de neuronas y la atrofia cerebral. Estas placas forman depósitos difusos compuestos de A β 42, más propensos a la agregación del péptido y de A β 4w0 que es menos hidrófobo. En individuos sanos, A β 40 constituye el 90% y

aproximadamente un 10% el A β 42, de los péptidos A β que producen normalmente las células cerebrales a lo largo de la vida de cada persona, es así que en bajas concentraciones potencian el hipocampo y mejoran la memoria. La proteólisis secuencial de dominios extracelulares beta (β) y gama (γ) secretasas forman una serie de péptidos que se acumulan hasta generar hojas β -amiloides. Los más insolubles de estos péptidos son los A β 42, quienes tienen una propensión para la auto-agregación a manera de fibrillas conocidas como placas seniles que se acumulan dentro del cerebro y desencadenan toda la patología de la EA (Castellani, Moreira, Zhu y Perry, 2014, p. 2 y Weiner et al., 2013, p.112).

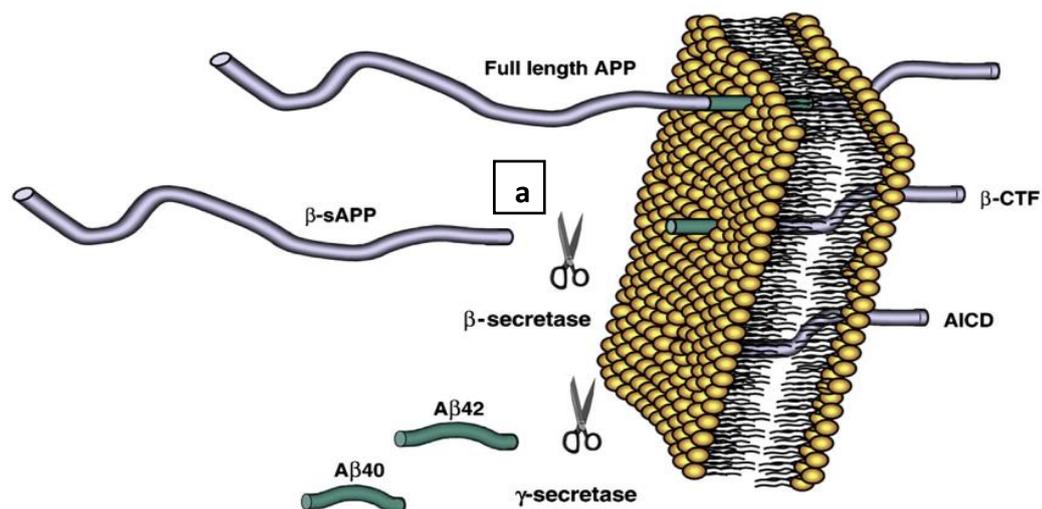


Figura 1. Péptido beta-amiloide.

Tomada de Weiner et al., 2013, p. 113.

a. Generación de péptido β -amiloide a partir de la β -secretasa y γ -secretasa.

2.4.2 Proteínas Tau

Las proteínas Tau están involucradas en la unión de microtúbulos, montaje y estabilización de las neuronas. Se encuentran en los axones y en la EA se distribuyen alrededor de las dendritas. En el cerebro humano se pueden

distinguir seis isoformas de las proteínas Tau que se diferencian entre sí por la presencia o ausencia de un inserto de 29 a 58 aminoácidos en el extremo amino-terminal y por la repetición de 31 aminoácidos, todos ellos codificados en el exón 10 del gen de *tau*. Normalmente, en el cerebro Tau es una fosfoproteína pero en la EA se hiperfosforila, siendo predominante en sitios que se encuentran formados por residuos de una Serina o Treonina seguidos de un residuo de Prolina (Crowther y Goedert, 2000, p. 66).

En la EA las proteínas Tau forman filamentos, conocidos como filamentos helicoidales o rectos, los cuales son incapaces de interactuar con el resto de microtúbulos debido a que se encuentran hiperfosforilados. Forman los ovillos neurofibrilares que provocan que las neuronas mueran y generen agregados que inducen la neurodegeneración (Medina y Avila, 2014, p. 23). Un cerebro humano sano posee 1.9 moles de fosfato por mol de Tau mientras que al estar afectado con la EA genera 6.8 moles de fosfato por mol de Tau (Spillantini y Goedert, 2013, p. 7).

2.4.3 Interacción A β -amiloide y Tau

En la EA se presentan abundantes placas neuríticas amiloideas extracelulares (placas seniles) y ovillos neurofibrilares intracelulares, causadas tanto por la oligomerización del péptido β -amiloide como de la hiperfosforilación de las proteínas Tau respectivamente. Esta acumulación causa la agregación, disfunción sináptica y muerte de las células nerviosas del cerebro (Spillantini y Goedert, 2013, p. 9). Los ovillos neurofibrilares están compuestos por formas aberrantes, hiperfosforiladas y fragmentadas de las proteínas Tau pero a diferencia de lo que pasa con el péptido A β , un metabolismo anormal de Tau puede estar relacionado con otras enfermedades neurodegenerativas, más conocidas como taupatías (Villegas, 2015, p.112).

Curiosamente, ambos se encuentran relacionados, debido a que Tau proporciona soporte a la cascada amiloide y A β puede conducir la patología Tau, aunque la deposición de esta proteína en el cerebro se cree que podría preceder a la formación de las plaquetas amiloides. No obstante, el péptido amiloide es necesario para la neurotoxicidad de Tau, pero se ha visto que a pesar de aplicar una terapia para combatir la formación de las placas seniles, no se ha logrado detener el progreso de la enfermedad. Esto sugiere que la EA puede ser impulsada por las proteínas Tau, independientemente de la existencia patológica de los péptidos amiloides, o puede que exista alguna redundancia entre las rutas de ambos (Giacobini y Gold, 2013, p. 24).

2.5 Clasificación de la enfermedad de Alzheimer

La EA se desarrolla durante un largo periodo preclínico que puede durar varias décadas, dependiendo de la edad en la que se inicie, se pueden clasificar en dos variedades: de aparición temprana (early-onset, EOAD) o tardía (late-onset, LOAD), tomando en cuenta si la enfermedad se desarrolla antes o después de los 65 años de edad. A pesar que un 1-2% de los casos de EA se conocen como tempranos, menos de la mitad pertenecen a la forma familiar, es decir que se hereda como un rasgo autosómico dominante de alta penetrancia mientras que en el LOAD puede ser causada por factores genéticos, ambientales o mixtos (Villegas, 2015, p.115).

2.5.1 Enfermedad de Alzheimer de aparición temprana

La herencia mendeliana está más relacionada con el inicio temprano de la EA familiar, ya que varias generaciones pueden verse afectadas. Se caracteriza por una rápida evolución clínica y por desarrollar los síntomas antes de los 60 años de edad (inclusive puede darse a los 30 o 40 años), pero menos del 10% de los pacientes con la EA presentan este tipo. Tiene una herencia autosómica dominante y se han reportado genes de susceptibilidad como: el gen precursor

de la proteína amiloide (*APP*, cromosoma 21), el gen de la presenilia 1 (*PSEN1*, cromosoma 14) y el de la presenilia 2 (*PSEN2*, cromosoma 1), y más de doscientas mutaciones identificadas en estos tres loci (Pilotto, Padovani y Borroni, 2013, p. 8). Aunque la patogénesis de la EA resulta compleja, se cree que en el 86% de las familias en las que aparece tempranamente tienen una mutación en *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*. La mutación en *PSEN1* es la causa más frecuente, representando el 60% de las familias mendelianas, el 15% corresponde a las mutaciones en *APP*, mientras que las mutaciones en *PSEN2* son muy escasas y raras. De igual forma, todas estas mutaciones conducen al aumento de la producción de proteínas amiloides que se acumulan y causan la muerte de las neuronas (Loy, Schofield, Turner y Kwok, 2014, p. 17).

2.5.2 Enfermedad de Alzheimer de aparición tardía

Existen otras variaciones genéticas a las mencionadas anteriormente, que contribuyen con la aparición de la EA, como es *apoE*. Este gen se encuentra presente en el cromosoma 19 (19q13.2) con un total de 3597 pares de bases, compuesto de cuatro exones y tres intrones que codifican para la apolipoproteína E (APOE), un tipo de lipoproteína de 299 aminoácidos encargada del metabolismo de los lípidos. Principalmente se sintetiza en el hígado, aunque se puede encontrar en otros tejidos como el cerebro, riñones, bazo, glándulas suprarrenales y gónadas. APOE funciona como un ligando para el receptor de aclaramiento mediado de lipoproteínas de muy baja densidad y participa en el transporte de colesterol. Se estima que existe una variación de alrededor 14% del colesterol sérico a causa del polimorfismo de *apoE* (Hu et al., 2011, p. 7).

Debido a la naturaleza polimórfica de *apoE*, este exhibe tres diferentes alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ que dan origen a seis diferentes genotipos (E2/2, E3/3, E4/4, E4/2, E4/3 y E3/2) y a tres principales isoformas de la proteína como es APO E2, E3 y E4. Estas isoformas son el resultado de los intercambios de Cisteína que se dan en los residuos 112 y 158. En E2 la Cisteína se produce en ambas posiciones, en E4 la Arginina es quien se encuentra en ambas posiciones, mientras que en E3

la Cisteína ocupa la posición 112 y la Arginina la posición 158. Se estima que E2, E3 y E4 tienen una frecuencia en la población mundial del 8.4%, 77.9 % y 13,7% respectivamente (*Figura 2*) (Liu, Kenekiyo, Xu y Bu, 2013, p. 4).

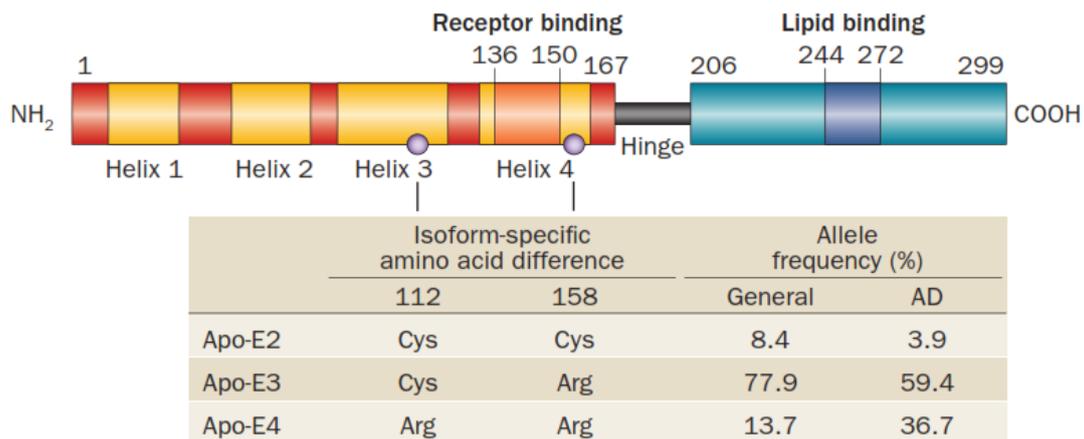


Figura 2. Isoformas de la apolipoproteína E, codificadas por *apoE*.

Tomada de Liu et al., 2013, p. 2.

A) Cuentan con 2 dominios estructurales, el dominio N-terminal y el dominio C-terminal, que contiene la región de unión con los lípidos.

2.6 Apolipoproteína E

En el cerebro APOE es la lipoproteína predominante y su expresión varía dependiendo del genotipo, siendo E2 el que se expresa con mayor frecuencia y E4 el de menor expresión. Aunque, *apoE* juega un papel importante sobre la concentración de APOE, puede variar de forma individual de acuerdo a factores como el índice de masa corporal, uso de anticonceptivos, el sexo, etc. Mientras que los portadores de E4 presentan un mayor riesgo a desarrollar la enfermedad y los E2 tienen mayor concentración de proteínas (Riedel, Thomson y Binton, 2016, p. 5).

En los tejidos periféricos, APOE se forma en el hígado y los macrófagos, por lo que se relaciona directamente con el metabolismo del colesterol y por ende, con

los casos de hiperlipidemia e hipercolesterolemia que conducen a desencadenar enfermedades como la arterosclerosis o cerebrovasculares. En el cerebro se produce principalmente por los astrocitos y transporta el colesterol entre las neuronas por medio de los receptores de APOE (Liu et al., 2013, p. 6).

APOE tiene un sitio de unión con A β en la región 230 a 243, en condiciones normales induce a la degradación de A β intracelular mediante el tráfico de amiloides a los lisosomas. Dependiendo de cada isoforma, la interacción entre APOE y A β varía, siendo más fácil la oligomerización en E4 que en E3 y E2. Se ha demostrado que APOE4 aumenta la deposición de oligómeros de A β y proteínas Tau. Mientras que los APOE3 impiden la fosforilación de Tau y su montaje en forma de filamentos helicoidales (Riedel et al., 2016, p. 8).

APOE juega un papel fundamental en el metabolismo de A β , puesto que los diferentes genotipos que presenta afectan directamente en la deposición de A β , provocando la formación de las placas seniles, una de las principales característica de la EA. Los depósitos de A β se tornan más abundantes en los portadores de APOE4 en relación a los no portadores, el 40,7% de los portadores presentan placas seniles a diferencia del 8,2% de los no portadores. Debido a que APOE4 presenta una eficiencia menor en el metabolismo de A β , provoca una acumulación que desencadena rápidamente en la conformación de las placas seniles y con ellas el inicio de la pérdida de la memoria, a diferencia de lo que sucede con APOE2 que tiene un efecto protector contra la enfermedad (Liu et al., 2013, p. 5).

2.6.1 APOE4

Es el principal factor genético de riesgo para desencadenar la EA, dado que el riesgo de la enfermedad en los homocigotos es del 50%, mientras que de un 20 al 30% para los E3 y E4 heterocigotos. Según el sexo, 14% para las mujeres y 11% para los hombres independientemente del genotipo que posean. Además, en esta enfermedad APOE4 interfiere en la depuración de A β en el cerebro

haciendo que la carga de este péptido sea mucho mayor a la normal con lo cual se origina la neurodegeneración (Masters et al., 2015, p. 3).

Las personas portadoras de APOE4 empiezan a sentir problemas con su memoria alrededor de los 50 años, mientras que el resto comienzan a experimentar dificultades para recordar diferentes cosas a los 70 años. Pero aquellos individuos que son homocigotos para E4 presentan una patología más agravada del péptido amiloide, a diferencia de los heterocigotos en los que disminuye la afección (Tuminello y Han, 2011, p. 3). No siempre se asocia APOE4 con el riesgo de un mayor deterioro cognitivo, debido a que pueden influir diversos factores, principalmente la historial familiar; es decir los antecedentes familiares tienen gran influencia. Los efectos de APOE4 dentro de la red cerebral, la tasa de deterioro cognitivo y rendimiento de la memoria dependen de la edad de los pacientes que sufren la EA (Donix, Small y Bookheimer, 2012, p. 300).

En estudios realizados a diversas poblaciones, la expresión de APOE4 es más débil en individuos afroamericanos e hispanos mientras que es más fuerte en japoneses e individuos blancos. La frecuencia de la EA a los 68 años es del 91% en E4 homocigotos, a los 76 años es del 47% en E4 heterocigotos y a los 84 años es del 20% en E4 no portadores. Esto evidencia que APOE4 incrementa el riesgo considerablemente a desarrollar la EA a temprana (Tabla 1) (Liu et al., 2013, p. 7).

Tabla 1.

Frecuencia de APOE4.

Característica	No portador	APOE4 Heterocigoto	Homocigoto
Frecuencia de la EA (%)	20	47	91
Edad de inicio (años)	84	76	68

Adaptada de Liu et al., 2013, p. 8.

Nota: La edad de inicio y la frecuencia de la EA se ven afectadas por el efecto APOE4.

2.7 Polimorfismos asociados con la enfermedad de Alzheimer

Se pueden clasificar de acuerdo a su impacto funcional utilizando la bioinformática y demás herramientas computacionales. En la EA se estudian los SNPs que afectan a la apolipoproteína E, puesto que se relacionan las mutaciones de *apoE* con la prevalencia de la enfermedad. SNPs en la región no sinónima de codificación [nonsynonymous SNPs (nsSNP)] y la región no traducida (UTR) son los principales responsables de la diversidad funcional. Los nsSNPs pueden resultar en alelos para la producción de diferentes polipéptidos. Las mutaciones observadas en nsSNP pueden ser sin sentido y de cambio en el marco de lectura. Además de las regiones de codificación, los SNPs también se pueden encontrar en regiones de mRNA no traducidas (UTRs) y regiones promotoras, lo que puede afectar la expresión del gen, el factor de transcripción, la secuencia de ARN no codificante y el splicing. Para el gen *apoE*, hay 31 nsSNPs, 8 de codificación sinónima SNPs, 33 SNPs en la región del intrón, y 3 SNPs en la región no traducida. En el caso de la EA de inicio tardío, existen muchos genes con 10 diferentes loci, todos ellos reunidos en los criterios de la lista del *Alzheimer Research Forum* o ALZGENE para asociaciones con la EA (Tabla 2). Si bien varios estudios han encontrado relación significativa de genes y variantes en el desarrollo de la enfermedad, aún no hay un consenso que indique del todo su correlación en la EA (Namboori et al., 2011, pp. 9-10 y Ridge, Ebbert y Kauwe, 2013, p. 18).

Tabla 2.

Genes y variantes de la EA de inicio tardío.

Variante	Gen	Abreviación	Riesgo/Protector
rs742	Apolipoproteína E	APOE	Riesgo
rs429358	Apolipoproteína E	APOE	Protector
rs744373	Integrador de puente 1	BINI	Riesgo
rs11136000	Clusterina	CLU	Protector
rs3764650	Casete de unión a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 7	ABCA7	Riesgo
rs3818361	Componente del complemento (3b/4b) del receptor 1 (grupo sanguíneo Knops)	CRI	Riesgo
rs3851179	Proteína de ensamblaje clathrin fosfatidilinositol	PICALM	Protector
rs610932	Membrana que abarca 4 dominios, subfamilia A, miembro 6	MS4A6A	Protector
rs3865444	Molécula CD33	CD33	Protector
rs670139	Membrana que abarca 4 dominios, subfamilia A, miembro 4E	MS4A4E	Riesgo
rs9349407	Proteína asociada CD2	CD2AP	Riesgo

Adaptado de Ridge et al., 2013, p. 19.

Nota: Están analizadas por la ALZGENE para indicar si aumentan el riesgo o proporcionan protección.

2.7.1 Métodos de detección de los polimorfismos de *apoE*

Al principio se utilizaba la técnica del isoelectroenfoque (IEF) para caracterizar las diferentes isoformas de APOE, la cual se basaba en la separación de dichas

moléculas del plasma sanguíneo según carga y luego, visualizándolas con tinciones para proteínas. Posteriormente, el proceso se simplificó con la utilización de membranas de nitrocelulosa para identificar las proteínas junto con su visualización por inmunotransferencia. Aunque estos métodos de IEF tenían la gran desventaja de ser poco confiables por su bajo poder discriminatorio entre variantes de APOE con la misma carga. Posteriormente, con la aparición de técnicas moleculares como la reacción en cadena polimerasa (PCR), el análisis genotípico de APOE mejoró considerablemente. De esta manera se han perfeccionado las estrategias de PCR para amplificar secuencias capaces de contener las variantes E2 y E4. Para genotipos de mayor tamaño se utiliza la amplificación por PCR de fragmentos específicos, seguido de un tratamiento con enzimas de restricción y su visualización mediante electroforesis. El polimorfismo genético de *apoE*, es resultado de la combinación de distintos alelos que pueden codificar proteínas con sustitución en un único aminoácido, con lo cual se define su papel en el metabolismo normal o anormal de las lipoproteínas (García, 2003, p. 88).

3. Diseño del plan experimental

3.1 Diseño experimental

La presente investigación se basó en un modelo de estudio transversal analítico de casos (pacientes) y controles. El experimento se realizó a conveniencia, pues se seleccionaron de manera aleatoria individuos pertenecientes a la sierra ecuatoriana. Tomando en cuenta las variables: edad (mayores a 65 años), género, genotipo de la apolipoproteína E y cantidad de alelos que poseen. Las mismas que se asociaron y compararon con la presencia de la EA (paciente o control). En la *Figura 3* se detalla el proceso experimental seguido para el desarrollo del estudio.

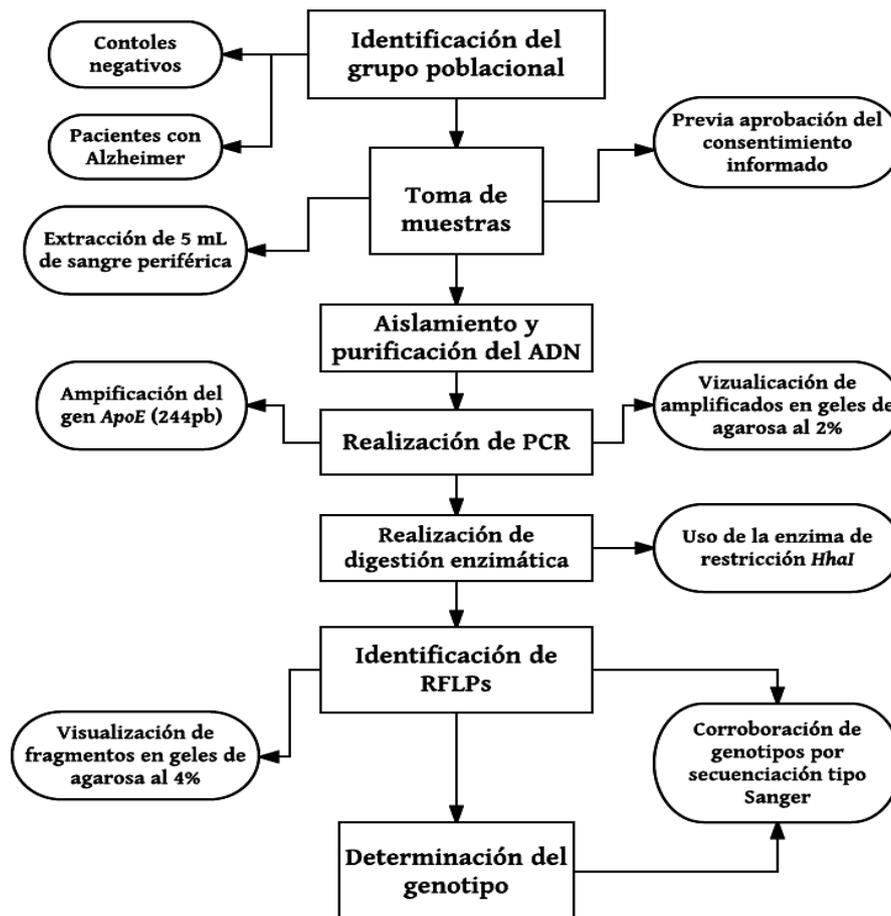


Figura 3. Diagrama de flujo con los pasos principales de la metodología a seguir para el desarrollo del proyecto.

4. Procedimientos

La presente investigación se realizó en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UDLA, y forma parte del proyecto “Identificación de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer en Ecuador”, llevado a cabo bajo la dirección de la M.Sc. Jennyfer Gracia. La investigación fue aceptada por el comité de bioética de la Universidad de las Américas.

4.1 Población y muestra

El desarrollo de esta investigación contó con la colaboración de varios institutos dedicados al cuidado de personas de edad avanzada que padecen de enfermedades mentales, los cuales permitieron el acceso hacia individuos de diversas provincias que padecen de la EA. Siendo la participación de cada individuo voluntaria mediante aceptación del consentimiento informado puesto en consideración a cada uno de ellos y sus representantes legales (Anexo 1).

4.1.1 Selección de individuos

La población estudiada estuvo conformada por 31 individuos de la sierra ecuatoriana diagnosticadas con la EA por el neurólogo, geriatra o psiquiatra de cada institución a la que pertenecen. De igual forma, se estudió un grupo control conformado por 79 individuos serranos, quienes no presentaban ningún tipo de enfermedad mental reportada hasta el momento, conformando así un grupo de estudio de 110 individuos.

Todos los individuos seleccionados tenían edades a partir de los 65 años y se excluyó a aquellos participantes con enfermedades que pudieran derivar en algún tipo de deterioro cognitivo. Para lo cual, a cada individuo se le realizó una encuesta para obtener toda la información asociada a su estado de salud y desarrollar una base de datos donde se registró cada parámetro informativo brindado por cada uno (edad, sexo, antecedentes familiares, consumo de fármacos, consumo de tabaco y alcohol, etc).

4.1.2 Obtención de la muestra biológica

A cada individuo se le realizó la toma de una muestra de sangre periférica, utilizando tubos de 4 mL con anticoagulante EDTA. Cabe recalcar que para la toma de muestras, previamente se contó tanto con la aprobación del instituto al

que pertenece cada individuo como del consentimiento informado aceptado por el representante legal de cada paciente mientras que en el caso de los controles cada persona dio personalmente su aprobación. Todas las muestras obtenidas fueron almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Extracción de ADN genómico a partir de sangre venosa

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de la muestra de sangre periférica de cada individuo, utilizando el kit comercial PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen™, California) y siguiendo las especificaciones dadas en el mismo.

Inicialmente se precalentó el bloque térmico a 55 °C. Paralelamente, en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL se colocaron 20 µL de Proteinasa K y 20 µL de RNasa A, se mezcló con vórtex y se dejó reposar 2 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 µL de la muestra de sangre de cada individuo, mediante vórtex por 1 min se homogenizó todo y se agregó 200 µL de Genomic Lysis Binding Buffer. Nuevamente, se mezcló con vórtex hasta obtener una muestra homogénea y se colocaron en el bloque térmico a 55 °C durante 10 min para promover la desnaturalización de las proteínas. Una vez completado el proceso, se retiraron los tubos del bloque térmico y se les añadieron 200 µL de etanol (95-100%). La solución obtenida se transfirió a la columna de purificación junto con el tubo colector, suministrados por el kit. Se rotuló de acuerdo al código asignado a cada individuo y se centrifugó a 10.000 g a temperatura ambiente durante 1 min. Luego se procedió a desechar el tubo colector con el líquido restante y se colocó cada columna en un nuevo y estéril tubo colector. Una vez hecho esto, a cada columna se agregaron 500 µL de Wash Buffer 1 (preparado con etanol 100%) y se centrifugó durante 1 min a 10.000 g en temperatura ambiente. De nuevo se repitió el proceso anterior pero esta vez, se agregó a cada columna 500 µL de Wash Buffer 2 (preparado con etanol 100%) y se centrifugó a máxima velocidad durante 3 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, se desechó el tubo colector y se procedió a colocar cada una de las columnas de purificación en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL. A cada uno se le añadieron 30 μ L de Genomic Elution Buffer en la parte central de la membrana interna de la columna, se dejó incubar por 1 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a máxima velocidad durante 3 min y se desechó la columna de purificación, obteniendo el ADN genómico purificado al final del tubo. El cual se rotuló y conservó inmediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar que las moléculas se puedan degradar hasta el momento de su uso.

4.2.2 Análisis cualitativo del ADN

Se determinó la calidad del ADN obtenido mediante pruebas de electroforesis horizontal. Se usó geles de agarosa al 1% preparados con TBE 1X (Tris, EDTA y ácido bórico) y bromuro de etidio (1 μ L por cada 20 mL de solución). Adicionalmente a las muestras se agregó 1 μ L de Loading Dye (Pomega, USA) por cada 4 μ L de ADN. De esta manera, todas las muestras fueron dispensadas en los geles junto con un marcador molecular Low DNA Mass Ladder (InvitrogenTM, California) y sometidas a una carga continua de 120 Voltios por 30 min. Luego se visualizó el peso molecular de las moléculas de ADN pertenecientes a cada muestra, comparando la fluorescencia emitida por el marcador molecular respecto a la fluorescencia de las muestras mediante el transiluminador con luz ultravioleta ImageQuant 300 (General Electric, Fairfield, SC).

4.2.3 Análisis cuantitativo del ADN

El análisis de la concentración (ng/ μ L) y pureza de las muestras de ADN se evaluó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts) a longitudes de onda de 260 y 280 nm. Se verificó que las relaciones entre cada longitud sea la óptima (entre 1,8 y 2). Posteriormente, se

realizaron diluciones de cada muestra de ADN madres con agua Mili-Q autoclavada para obtener alícuotas de 20 μ L con una concentración de 30 ng/ μ L.

4.2.4 Determinación del genotipo

El gen de estudio (*ApoE*), fue analizado mediante la técnica de PCR y con la utilización de cebadores específicos que permitieron su amplificación, la cual se corroboró mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%. Posteriormente, los productos obtenidos fueron sometidos a una restricción enzimática (RFLPs) y el genotipo se determinó en geles de agarosa al 4%, los cuales se verificaron con la secuenciación tipo Sanger.

4.2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la amplificación se utilizó el ADN obtenido de las muestras de sangre periférica y los cebadores específicos para el gen *ApoE*. Se empleó la herramienta en línea para diseño de *primers* de la National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de esta manera se estableció la secuencia para cada uno de ellos, los cuales son: APOE Forward: 5'-ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACAC-3' y APOE Reverse: 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3', que generaron un fragmento de 244 pb. Dichos cebadores concuerdan con los utilizados para amplificar la secuencia del gen de la *apoE* por Emi *et al.* (1988).

La PCR se estandarizó con la temperatura de melting o fusión (T_m) de dichos cebadores, obteniendo su óptima amplificación bajo las siguientes condiciones descritas en la Tabla 3 empleando 40 ciclos.

Tabla 3.

Condiciones programadas en el termociclador para la amplificación.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
Desnaturalización	95°C	60 segundos
Hibridación	62°C	90 segundos
Extensión	70°C	45 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

Cada reacción de PCR se realizó en un cuarto aislado dentro de una cámara de flujo laminar que aseguraron la esterilidad del ambiente y del proceso de elaboración. Para realizar la amplificación, la reacción se ajustó a un volumen de 25 µL por muestra y estuvo compuesta por los reactivos descritos en la Tabla 4.

Tabla 4.

Reactivos utilizados para la preparación de las reacciones de PCR.

Reactivo	Concentración
Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, USA)	10x
Cloruro de Magnesio (MgCl₂)	50 mM
Mix de dNTPs (dideoxinucleótidos trifosfato)	10 mM
Cebadoras Forward y Reverse	10 mM
Taq DNA Polimerasa (Invitrogen™, California)	5 U/µL
H₂O Mili-Q	---
Muestra de ADN	30 ng/µL

La correcta amplificación del fragmento se comprobó utilizando electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y la migración de los amplicones se realizó a 100 Voltios durante 40 minutos. No se utilizó ningún buffer de carga debido a que el GoTaq® Buffer (Promega, USA) usado en cada reacción, contiene colorantes (azul y amarillo) que permiten la rápida carga y observación de los amplicones en el gel. Por tanto, se procedió con la

visualización de las bandas amplificadas con ayuda del transiluminador con luz ultravioleta ImageQuant 300 (General Electric, Fairfield, SC). Se verificó que los amplicones tengan 244 pb correspondientes al fragmento amplificado por los cebadores, para lo cual se comparó con el marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, USA) cargado en el gel a la par de las demás muestras.

4.2.4.2 Restricción enzimática

Una vez obtenidos los amplicones de la PCR, se los sometió a una digestión con enzimas de restricción (RFLP). Para la reacción de digestión se utilizaron los reactivos descritos en la Tabla 5 ajustando un volumen final de 20 μ L para cada una de las muestras.

Tabla 5.

Reactivos utilizados para la preparación las reacciones de restricción.

Reactivo	Concentración	Cantidad
Buffer Tango (Thermo Scientific, USA)	10x	2 μ L
Enzima <i>HhaI</i> (Thermo Scientific, USA)	10 U/ μ L	0,5 μ L
Producto de PCR	---	10 μ L
H₂O Mili-Q	---	7,5 μ L

Posteriormente, se procedió a observar los fragmentos obtenidos utilizando geles de agarosa al 4% con bromuro de etidio. Las corridas se realizaron en una cámara de electroforesis horizontal sumergiendo los geles en una solución de TBE 1x a 120 Voltios durante 2,5 horas. Se visualizaron las bandas con ayuda del transiluminador con luz ultravioleta y se utilizó como referencia un marcador molecular de 10 y 25 pb (Promega, USA) para determinar el tamaño y cantidad de fragmentos obtenidos. Mismos que sirvieron para establecer finalmente el genotipo correspondiente a cada muestra.

4.2.5 Secuenciación tipo Sanger

Una vez establecidos los genotipos de cada una de las muestras por medio de la restricción enzimática, se procedió a corroborar la existencia de los mismos mediante secuenciación tipo Sanger. Para lo cual se seleccionaron muestras correspondientes a cada genotipo obtenido de la población estudiada y de esta manera, validar lo visualizado en los geles de agarosa.

4.2.5.1 Purificación de los productos de PCR mediante Ampure

Luego de haber verificado la correcta amplificación del fragmento de PCR de 244 pb (gen *apoE*) y de seleccionarse las muestras a secuenciar, se procedió con el lavado de cada fragmento mediante el método de purificación Agecourt AMPure[®] XP (Beckman Coulter, California). El cual consiste primero con la homogenización del AMPure[®] mediante vórtex a temperatura ambiente, seguido de su colocación en tubos de 0,2 mL. Se colocaron 15 µL de AMPure[®] junto con 10 µL del producto de PCR y se mezclaron las muestras con vórtex durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se colocaron todos los tubos en una placa magnética durante 5 minutos hasta observar la formación de un anillo en la parte central. Luego se aspiró todo el contenido líquido de cada tubo procurando no tocar el anillo, se añadieron 200 µL de etanol fresco al 70% y se lo dejó durante 30 segundos. En seguida se eliminó todo el etanol por inversión de la placa junto con los tubos sobre un papel absorbente con mucho cuidado. Se repitió nuevamente el lavado adicionando más etanol para eliminar todo remanente del fondo de los tubos. Sin tocar el anillo se eliminó todo el remanente de etanol que pudiese haber quedado y se dejó secar a 37°C dentro de la incubadora durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo y una vez que los tubos se secaron, se los retiró de la placa magnética para agregarles 30 µL de H₂O Mili-Q y mediante vórtex se resuspendieron las muestras, observando que el agua agregada se torne color marrón. Nuevamente, se colocaron los tubos en la

placa magnética y se los dejó en reposo por 30 segundos a temperatura ambiente. Finalmente se extrajo todo el contenido líquido de los tubos con cuidado de no tocar el anillo formado en las paredes de la parte central de cada tubo y dicho líquido se transfirió a nuevos tubos estériles de 0,2 mL y se los almacenó a -20°C.

4.2.5.2 PCR de secuenciación

Con los fragmentos obtenidos de la PCR convencional de *apoE* de 244 pb y purificados por el AMPure, se procedió a realizar una PCR de secuencia. Para lo cual, se ajustó la reacción por muestra a un volumen final de 6 µL y estuvo compuesta de acuerdo a lo descrito en la Tabla 6.

Tabla 6.

Reactivos utilizados para la preparación las reacciones de PCR de secuenciación.

Reactivo	Concentración	Cantidad
BigDye Terminator Sequencing Buffer (Applied Biosystems™, USA)	5x	0,9 µL
BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems™, USA)	5x	0,5 µL
Cebador (Forward o Reverse)	1mM	1,6 µL
Producto de PCR purificado	---	1,5 µL
H₂O Mili-Q	---	1,5 µL

Una vez listas las reacciones para cada muestra, la PCR de secuencia se realizó en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies, USA) bajo las condiciones descritas en la Tabla 7.

Tabla 7.

Condiciones programadas en el termociclador para la PCR de secuenciación.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	96°C	3 minutos
Desnaturalización	96°C	10 segundos
Hibridación	50,5°C	5 segundos
Elongación	60°C	4 minutos

4.2.5.3 Purificación de la PCR de secuencia mediante Cleanseq®

El método de purificación Cleanseq® (Beckman Coulter, California) se utilizó para purificar los nuevos amplicones obtenidos de la PCR de secuencia. Para lo cual, primero se homogenizó el reactivo Cleanseq® utilizando vórtex a temperatura ambiente, luego se colocó 2 µL del mismo en nuevos tubos estériles de 0,2 mL junto con 16,2 µL de etanol fresco al 85%, 6 µL del producto de PCR de secuencia y se dejó reposar por 30 segundos en la placa magnética. Después, se eliminó todo el líquido de los tubos mediante inversión de la placa sobre papel absorbente y se repitió el proceso añadiendo más etanol al 85%. Se eliminó todo el remanente residual encontrado en el fondo de los tubos y se los dejó secar en la incubadora a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, se agregaron a cada tubo 20 µL de H₂O Mili-Q, se resuspendió las muestras con vórtex y se dejaron por un momento corto en la placa magnética hasta que se forme el anillo. Luego se retiró con cuidado 20 µL de cada tubo, los mismos que serían colocados en el plato de secuenciación para su lectura.

4.2.5.4 Secuenciación mediante electroforesis capilar

Una vez listo el plato de secuenciación con cada muestra se lo colocó en el equipo The Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Texas), el cual realizó una electroforesis capilar de cada fragmento para

determinar las secuencia aminoacídica de los mismos. El equipo funciona bajo las especificaciones dadas en el software que permite generar las cadenas de aminoácidos, ABI PRISM® Data Collection V3.0 (Applied Biosystems, Texas). El orden en el que se encuentran los aminoácidos en cada muestra se analizó tanto en el Sequencing Analysis Software 5.3.1 (Applied Biosystems, Texas) propio del equipo, como en el software académico Geneious R10 (Biomatters, Nueva Zelanda). Se realizó el alineamiento de cada secuencia obtenida junto con fragmentos obtenidos en el GeneBank correspondientes a cada alelo estudiado para finalmente establecer el genotipo de cada muestra.

4.3 Evaluación estadística de los datos

Se analizó toda la información recopilada de cada individuo para así establecer la frecuencia del género, edades y hábitos. De igual forma, se buscó calcular la frecuencia genotípica de cada uno, estableciendo el número de homocigotos y heterocigotos encontrados. Además de cada una de sus variantes alélicas presentes. Todos los datos obtenidos se evaluaron utilizando los softwares GraphPad, STRUCTURE y Genepop.

4.3.1 Procesamiento estadístico de los resultados con el paquete GraphPad

El análisis estadístico de los resultados se efectuó con la aplicación Prisma v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Las pruebas de normalidad de los datos se realizaron de acuerdo a de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov–Smirnov. La significancia estadística en la prueba de *Student* fue $p=0.05$. El análisis se realizó de acuerdo al tipo de distribución de los datos: (1) asumiendo distribución normal o (2) prueba no paramétrica. El análisis de varianza (*one way ANOVA*) se realizó con una prueba de Dunn's en un modo aleatorio con una significancia estadística de $p=0.05$

4.3.2 Análisis de la estructura poblacional con el programa STRUCTURE

La evaluación de la estructura de la población conformada por los pacientes afectados con EA y los controles correspondientes (N=110) se realizó en base al método Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.3.4 (Falush et al., 2003, p. 4 y Pritchard, Stephens y Donnelly, 2000, p. 9). Se realizaron simulaciones para los valores de K=1-5 con 10 réplicas en cada caso. Las corridas se realizaron con 100 000 réplicas de calentamiento (*burn-in*) y la aplicación de 100 000 MCMC (Monte Carlo de cadenas de Markov). El modelo empleado implicó la existencia de correlación entre la frecuencia alélica y el grado de mezcla de la población. El valor del número de clústeres (K) más probable fue realizado en base a la probabilidad Ln estimada de los datos (*Estimated Ln Probability of Data*) (Rosenberg et al., 2001, p. 16) o de acuerdo al valor de ΔK (Evanno, Regnaut, y GOUDET, 2005), los que están implementados en el STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012, p. 3).

4.3.3 Análisis con el programa Genepop

Los parámetros genéticos fueron calculados en la aplicación Genepop v 4.4 (Raymond y Rousset, 1995, p. 66 y ROUSSET, 2008), en el cual se generan un acumulado de datos que permiten simular las frecuencias alélicas. El algoritmo usado, implicó la utilización del método de la cadena de Markov (que emplea el método exacto de Fisher) para estimar los valores de probabilidad significativa. La hipótesis nula indica que los gametos se unen de modo aleatorio (F_{IS} corresponde con cero), lo que corresponde con la existencia del equilibrio de Hardy-Weinberg. Por lo tanto para que la población esté en equilibrio de HW el F_{IS} debe ser cero. El estadístico F_{IS} fue determinado por los métodos de multilocus de W_{yC} (Weir y Cockerham, 1984, p. 8) y R_{yH} (Robertson y Hill, 1984, p. 37). Los valores de los F_{ST} , fueron determinados en base al ANOVA (Weir y Cockerham, 1984, p. 11).

5. Resultados y Discusión

5.1 Análisis de las edades de los individuos involucrados en el estudio

En el presente estudio se tomaron muestras biológicas de un total de 110 individuos procedentes de distintas provincias de la sierra ecuatoriana. Sin embargo, no existe una cantidad equilibrada de individuos de cada provincia que conforman la región sierra pero se cuenta una proporción importante de acuerdo al alcance de la investigación. Esto debido a que para la selección de sujetos y toma de muestras, se realizó a conveniencia porque se dependía tanto de la aprobación de cada individuo como del presupuesto establecido. A pesar de todo, se obtuvo una cantidad importante de participantes en el estudio (n=110), aunque en mayor medida controles que pacientes; de igual manera una abundante participación del sexo femenino.

De toda la población analizada, el 77,3 % fue de sexo femenino mientras que solo el 22,7% correspondió al sexo masculino. En cuanto a las edades existió un rango de 65 a 97 años y el análisis indicó que la edad media de la muestra poblacional fue de 74 años. Del total de los individuos, el 56,4% presentaron edades entre 65 y 73 años mientras que el 43,6 % de los individuos se caracterizaron por tener edades superiores a la edad media (Tabla 8).

Tabla 8.

Frecuencia de la edad y sexo del total de la muestra poblacional evaluada.

Edad	Hombres	%	Mujeres	%	Total	%
65-74	11	44	51	60	62	56,4
≥75	14	56	34	40	48	43,6
Total	25	22,7	85	77,3	110	100

5.1.1 Distribución de la muestra poblacional de los pacientes y los controles negativos

Del total de individuos estudiados ($n=110$), 31 correspondieron a pacientes diagnosticadas con la EA y 79 a personas aparentemente sanas (controles). La distribución de los pacientes según el género indicó que el 35,5 % correspondió a los hombres y el 64,5% mujeres. Para los controles los valores fueron 17,7% (hombres) y 82,3% (mujeres) (*Figura 4*). En ambos grupos la cantidad de mujeres fue mayor que la de hombres. Sin embargo, en el caso de los controles el balance de géneros tuvo mayor diferencia. Estos resultados concuerdan con los reportados por Gao et al. (1998, p. 6) los que encuentran una mayor predisposición a la enfermedad en las mujeres.

En contraste con otros tipos de demencia, en el caso de la EA no hay evidencias que sustenten alguna relación entre la prevalencia de la enfermedad y el nivel educacional (Fratiglioni et al., 1991, p. 22).

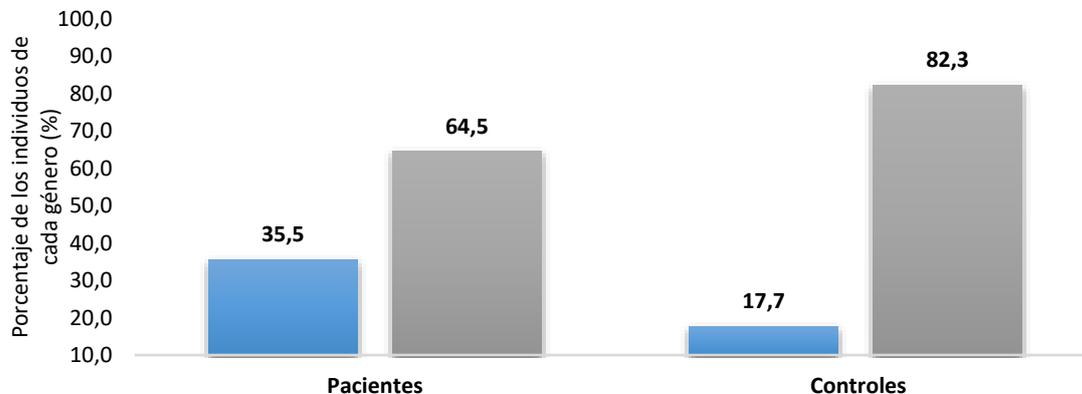


Figura 4. Distribución según el género de la muestra poblacional de pacientes afectados con EA y los controles.

a) ■ género masculino ■ género femenino.

En el histograma de frecuencias de edades para los controles (*Figura 5A*) y los pacientes (*Figura 5B*) se puede observar que gráficamente los pacientes siguen una distribución normal.

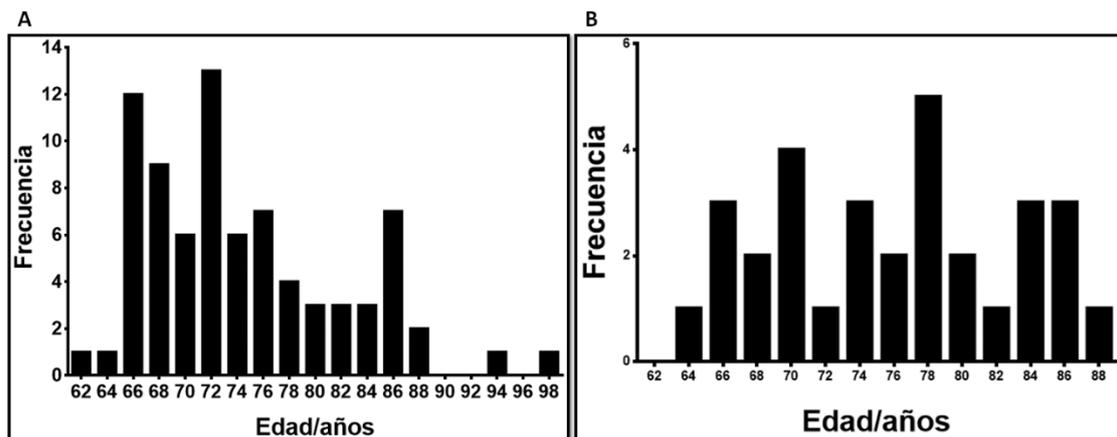


Figura 5. Histograma de frecuencias de las edades de los individuos involucrados en el estudio.

A) Controles conformados por los individuos aparentemente sanos.

B) Pacientes afectados por la EA.

Para los controles las edades estuvieron enmarcadas entre 62-97 años. En este grupo la edad media fue de 74 años. Para el grupo conformado por los pacientes las edades estuvieron en el rango 63-87 años y la media fue 75 años. En ambos casos la desviación estándar de la media fue 7 años.

La división de las edades de los pacientes y los controles también se analizó en el contexto de cada género (Figura 6). Sólo en el caso de los controles-mujeres los datos no tuvieron una distribución normal. El análisis de varianza correspondiente luego de normalizar los datos demostró que no existieron diferencias significativas en relación a las edades de cada uno de los grupos (controles y pacientes) divididos en el contexto de género. Por otra parte, el análisis de varianza empleando un método no paramétrico indicó diferencias estadísticamente significativas sólo en los grupos de las mujeres (controles vs pacientes). Puesto que existe una mayor presencia de individuos de sexo femenino en el estudio, debido a que de manera general las mujeres presentan una mayor esperanza de vida en relación a los hombres. Existe una mayor prevalencia de la EA en mujeres, lo que concuerda con varios estudios que indican que el padecimiento es más prevalente en las mujeres por su mayor

longevidad. No obstante, aún es incierto que el sexo incida en la EA, algunos estudios atribuyen dicha diferencia al nivel educativo pero lo que sí está comprobado, es que el envejecimiento es el factor que más incide en el deterioro cognitivo de las personas (Bermejo, Llamas y Villarejo, 2016, p. 10).

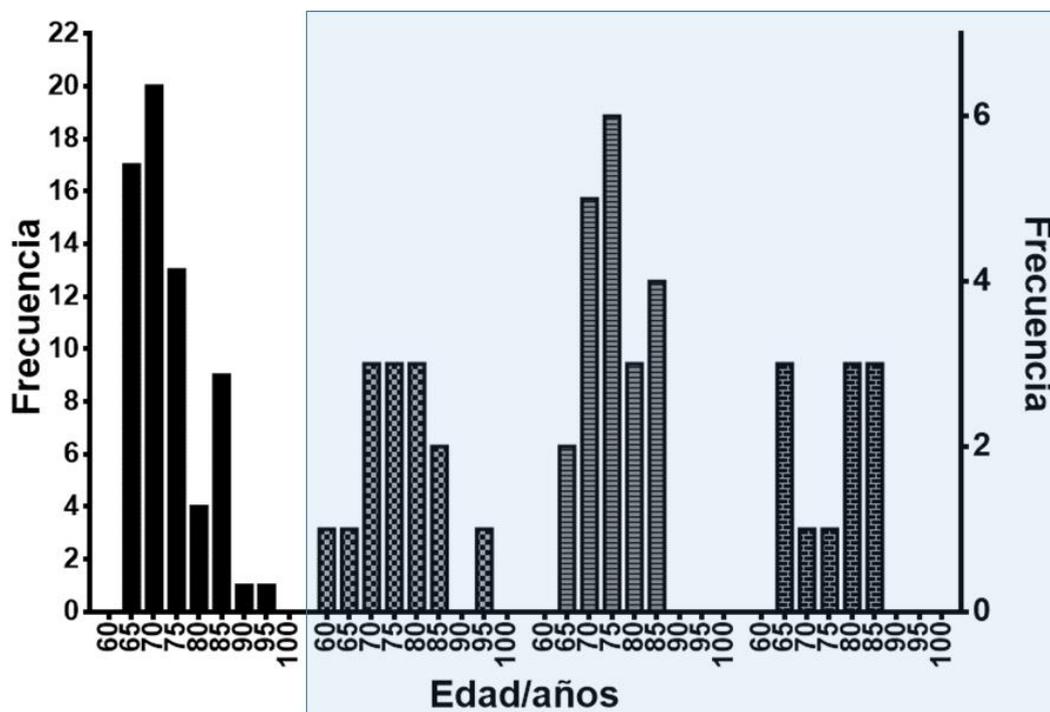


Figura 6. Evaluación de la distribución de las edades de los individuos afectados por EA y los controles conformados por individuos aparentemente sanos.

A) Los resultados se muestran en el orden (de izquierda a derecha) controles-mujeres (eje y, primario), controles-hombres, pacientes-mujeres, pacientes-hombres.

B) Los tres últimos subgrupos están representados en el eje secundario (resaltado en un recuadro en azul), debido a que presentan una distribución normal.

Los rangos de edades de los pacientes que conforman la muestra poblacional de este estudio está en correspondencia con otros trabajos, en los que se evidencia que este padecimiento afecta fundamentalmente a individuos de edades avanzadas (mayores de 65 años) (Fratiglioni et al., 1991, p. 24 Gao et al., 1998, p. 19). Esto debido a que se considera a la edad como el principal

factor de riesgo de la EA (más del 90% aparece a edades avanzadas). El tipo hereditario de la EA se da a edades inferiores, es muy raro pero se ha encontrado en poblaciones específicas (pertenecientes a una región determinada). Además, se suma el hecho de los avances tecnológicos actuales, los cuales han permitido que la probabilidad de vida de cada persona aumente. Conforme se envejece aparecen una serie de cambios en el organismo producto del desgaste del mismo, que lo hace más susceptible a una serie de padecimientos. Tal es el caso de las enfermedades demenciales, siendo el Alzheimer la más común y cuya patología aumenta según la edad. Alrededor del 15% de las personas mayores a 65 años desarrollan algún tipo de demencia y al superar los 85 años, el riesgo se incrementa hasta un 35% (Científica, 2010). Por tanto, para este estudio se consideró a individuos con edades avanzadas y así se encontró que la mayoría de individuos afectados por la EA, presentan edades superiores a los 74 años, quienes tendrían aparentemente un mayor riesgo a desarrollar la enfermedad.

5.2 Evaluación del ADN

El análisis cualitativo del ADN obtenido a partir de las 110 muestras de sangre periférica (controles y pacientes), mostró que este se encontraba no fragmentado, lo que se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa.

La concentración promedio de ADN, determinada de acuerdo a la cuantificación, tuvo un valor de 6 ng/ μ L. La concentración más baja fue de 14,8 ng/ μ L y la más elevada de 172 ng/ μ L (Anexo 2).

La obtención de ADN puro e íntegro es fundamental para el desarrollo exitoso de las técnicas moleculares en donde se lo vaya a utilizar (Wang et al., 2005). Por tanto, las concentraciones alcanzadas fueron buenas y de una calidad aceptable, permitiendo la normal realización de las técnicas posteriores.

electroforesis de igual manera sólo detectan una banda a la altura de 244 pb (*Figura 8*) (Hu et al., 2011, p.66).

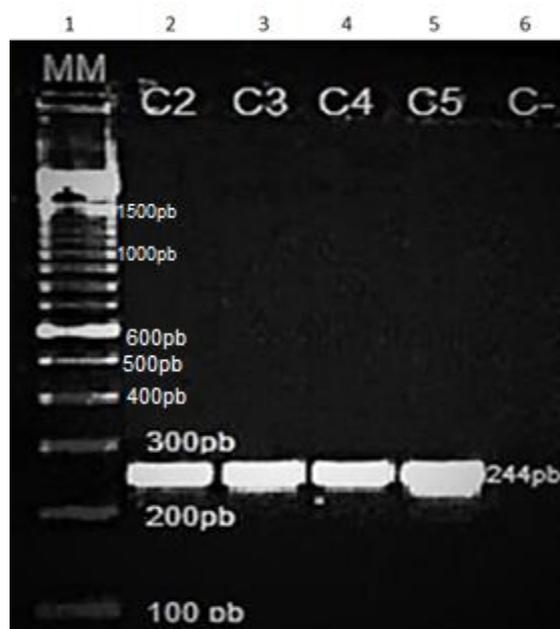


Figura 8. Electroforesis del fragmento del gen *apoE* de 244 pares de bases en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

A) Carril 1: Marcador de peso molecular con diferencias de 100 pb (MM).

B) Carriles 2-5: Amplificaciones de *apoE*.

C) Carril 6: Control negativo (sin muestra de ADN).

5.4 Determinación del genotipo

5.4.1 Restricción enzimática (RFLPs)

Se obtuvieron fragmentos de 91 pb, 83 pb, 72 pb, 48 pb y otros menores a 35 pb en todas las muestras poco visibles pero que no aportan mayor información para la identificación del genotipo (*Figura 9*). Estos resultados están en correspondencia con los reportados por otros autores, en los que se identifican los genotipos asociados a los cambios alélicos del gen de *ApoE* mediante la

amplificación por PCR y posterior análisis de los fragmentos obtenidos por la digestión con una enzima de restricción (Kaya et al., 2015, p. 22).

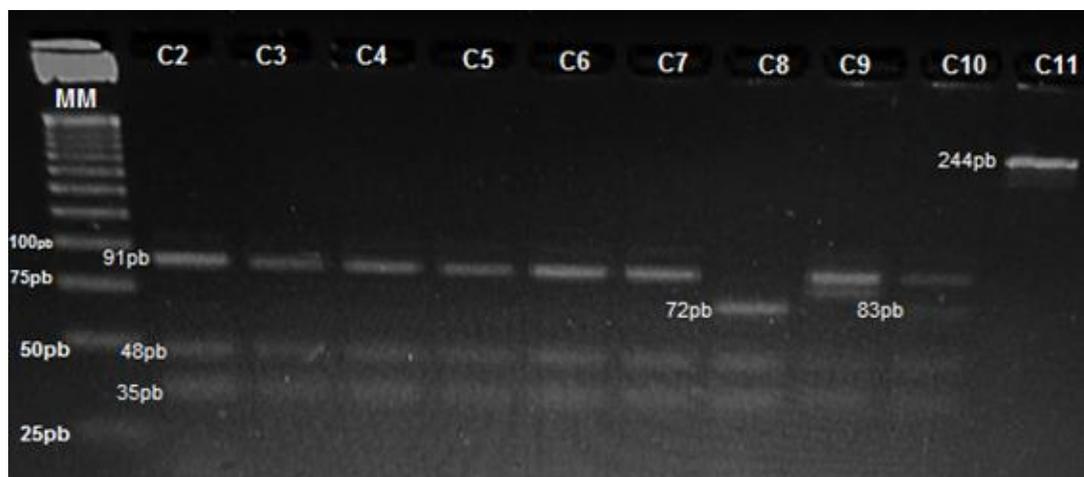


Figura 9. Imagen del gel de agarosa de los RFLPs.

- A) Carril 1: Marcador de peso molecular con diferencias de 25 pb.
- B) Carriles 2-7 y 9: Fragmentos correspondientes al genotipo E3/E3.
- C) Carril 8: Fragmentos correspondientes al genotipo E4/E4.
- D) Carril 10: Fragmentos correspondientes al genotipo E3/E2.
- E) Carril 11: Amplificado de 244 pb correspondiente al gen *apoE*.

El genotipo de cada uno de los individuos fue obtenido de acuerdo al tamaño de los fragmentos detectados en el análisis mediante electroforesis de los productos de la acción de *HhaI* (Tabla 9), de acuerdo a otros trabajos que han establecido el tamaño de fragmento correspondiente a cada genotipo (Hu et al., 2011, p. 23 y Singh et al., 2006, p. 77).

Tabla 9.

Tamaño de fragmentos obtenidos por la acción de la enzima de restricción HhaI sobre el amplicón del gen apoE.

Genotipo	Longitud de los fragmentos (pb)
E2/E2	91 + 83
E3/E3	91 + 48
E4/E4	72 + 48
E2/E3	91 + 83 + 48
E2/E4	91 + 83 + 72 + 48
E3/E4	91 + 72 + 48

Adaptado de Hu et al., 2011, p. 24.

Nota: Estos productos están asociados a cada uno de los genotipos identificados en este estudio

5.4.2 Secuenciación automática del ADN por el método de Sanger

Los genotipos obtenidos por la técnica de RFLPs, se verificaron mediante secuenciación capilar sólo para algunos de los representantes de las variedades genéticas obtenidas mediante el análisis de PCR y electroforesis en geles de agarosa. Ya que la investigación se orientó más hacia el análisis de los RFLPs, y se dejó a la secuenciación solo para validar los resultados observados. Utilizando el software Geneious se alineó todo con secuencias adquiridas del Genbank correspondientes a cada variante alélica (E2, E3, E4) para corroborar la su presencia en los genotipos obtenidos. En la *Figura 10* se observa la representación gráfica (electroferograma) producto del alineamiento realizado para identificar la presencia de cada alelo. Sin embargo, se analizó la presencia de cada alelo, más no su homocigosidad o heterocigosidad. Porque los amplicones obtenidos permitieron obtener únicamente eso, debido a que su diseño se destinó para la obtención de los RFLPs.

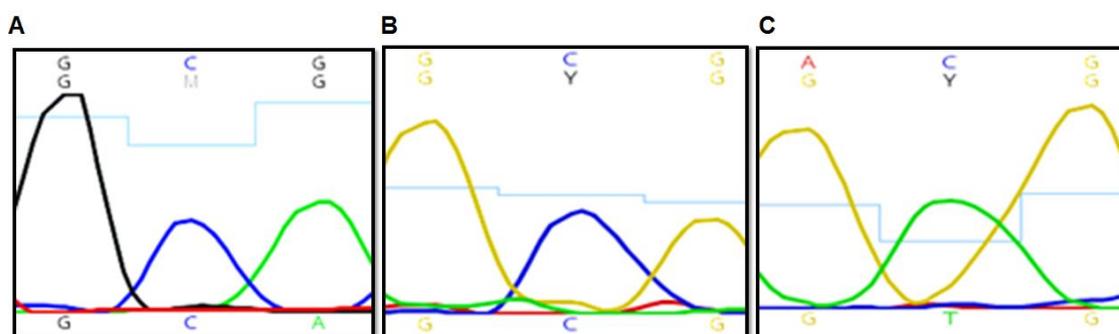


Figura 10. Visualización de cada genotipo de *apoE* por secuenciación.

- A) Secuencia correspondiente al genotipo con la variante alélica E2.
- B) Secuencia correspondiente al genotipo con la a la variante alélica E3.
- C) Secuencia correspondiente al genotipo con la a la variante alélica E4.

5.4.3 Análisis de los cambios de la estructura a nivel de la cadena polipeptídica

Cada una de las formas alélicas de la *apoE* está asociada a diferentes estructuras polipeptídicas. La superposición de cada una de las estructuras tridimensionales de las proteínas (APOE) presentes en las muestras de los individuos analizadas indica cambios estructurales que potencialmente pudieran afectar la estructura funcional de esta proteína (*Figura 2*). Los residuos que distinguen a las diferentes isoformas se encuentran en la posición 112 y 158 donde E2 tiene Cisteína en ambas, E3 posee una Cisteína en 112 y una Arginina en 158; y que E4 tiene una Arginina en ambos lugares (Kanekiyo et al., 2014, p.102).

El análisis desde el punto de vista de las estructuras de las proteínas está en correspondencia con las evidencias en relación a que este alelo está implicado en mayor medida con el desarrollo de la EA (Kanekiyo, Xu y Bu, 2014, p. 109). Presumiblemente puede ser mediante un mecanismo que implica la agregación y precipitación de la estructura A β en el cerebro, que se asocian al desarrollo de esta enfermedad (Selkoe, 1997).

5.4.4 Distribución y frecuencia de los genotipos de la Apolipoproteína E

De los 110 individuos de la población de la sierra ecuatoriana, se encontraron únicamente los genotipos E3/E3, E3/E4, E4/E4 y E3/E2. Donde el 69% representa el genotipo E3/E3, el 20% E3/E4, el 5,5% E4/E4 y el 5,5% E3/E2, siendo el E3/E3 la variante más común encontrada en toda la población estudiada (*Figura 11*).

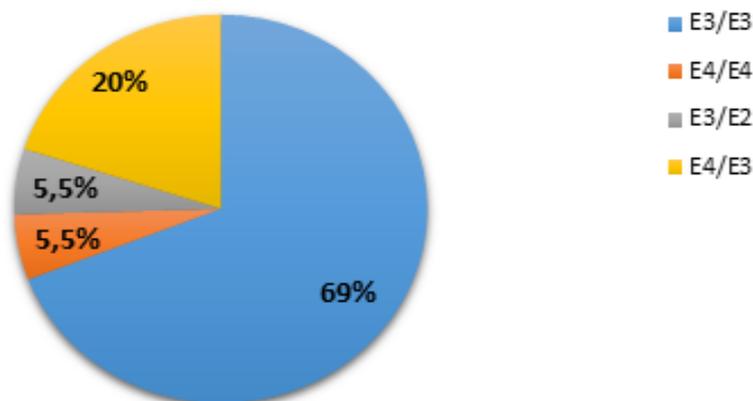


Figura 11. Distribución de los genotipos en la muestra poblacional de la sierra ecuatoriana implicada en el estudio (incluye los controles y pacientes en su totalidad).

De acuerdo al género, las distribuciones de las frecuencias genotípicas en los pacientes de sexo masculino se encontraron que el 18 % posee el genotipo E3/E3, el 27% es E4/E4, el 18% es E3/E2 y el 36% es E4/E3. En los pacientes de sexo femenino se encontró que el 55% es E3/E3, el 10% es E4/E4, el 15% es E3/E2 y el 20% es E4/E3. Por otra parte, en el grupo de controles de sexo masculino se encontró que el 79% es E3/E3, el 21% es E4/E3 pero no se registró la presencia del genotipo E4/E4 ni del E3/E2 en dicho grupo. Mientras que en el caso del grupo de controles de sexo femenino se encontró que el 80% es E3/E3, el 17% es E4/E4, el 1,5% es E3/E2 y 1,5% es E4/E3 (Tabla 10).

Tabla 10.

Distribución y frecuencia genotípica de acuerdo al género para cada uno de los grupos poblacionales evaluados.

Grupo	Pacientes				Controles				Total			
	Hombres		Mujeres		Hombres		Mujeres		Hombres		Mujeres	
Genotipo	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
E3/E3	2	18	11	55	11	79	52	80	13	52	63	74
E4/E4	3	27	2	10	0	0	11	17	3	12	13	15
E3/E2	2	18	3	15	0	0	1	1,5	2	8	4	4,7
E4/E3	4	36	4	20	3	21	1	1,5	7	28	5	5,9

Las frecuencias de cada uno de los genotipos tanto en los controles como los pacientes indican al tipo E3/E3 como el más representativo, con un 80,25 % y 46,88 %, respectivamente. Posteriormente le continúa en importancia el E3/E4, con 17,28 % en los controles y 28,13% en los pacientes. Los genotipos menos representados son los E4/E4 con valores de 1,23 % y 9,38 % para los controles y los pacientes, respectivamente (*Figura 12A*).

El genotipo E3/E3 para toda la población muestreada (controles y pacientes) es el más abundante, lo que sugiere que la población de la sierra ecuatoriana pudiese presentar mayormente dicho genotipo. Sin embargo, no se puede afirmar que toda la región pueda presentar la misma tendencia genotípica debido a que el tamaño de la muestra no es lo suficientemente grande para confirmarlo. Pero lo obtenido se asemeja a lo reportado en estudios similares realizados a otras poblaciones, Marca et al. (2011, p. 18) encontraron que evidentemente la variante E3/E3 es la tendencia más observada a nivel mundial. También con frecuencias no muy lejanas se observa sus variantes heterocigóticas, tal es el caso del genotipo E3/E4 que presenta una distribución considerable, mientras que E2/E3 se encuentra en menor proporción. Lo que no se aleja mucho a lo obtenido en este estudio, donde se encontró E3/E4 en parte importante y una escasa cantidad de E2/E3.

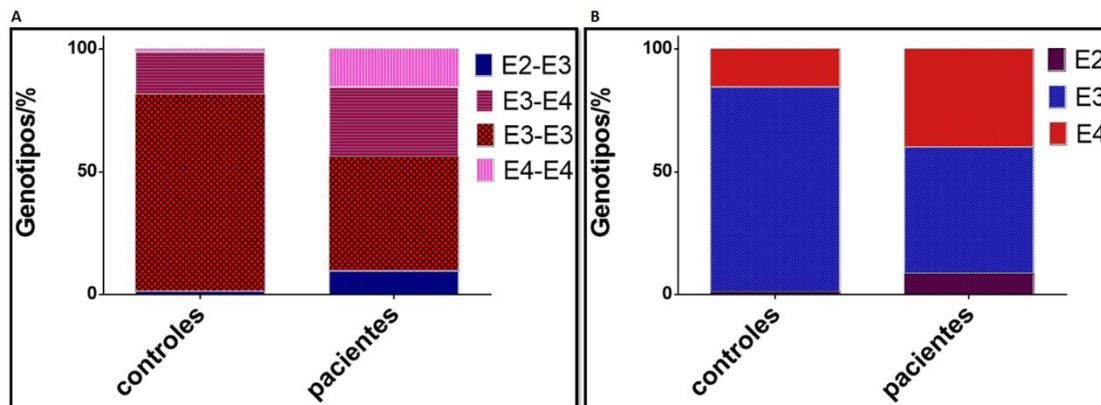


Figura 12. Distribución del polimorfismo de apoE encontrados en pacientes y controles.

A) Porcentaje de cada uno de los genotipos.

B) Porcentaje de cada una de las variedades alélicas encontradas en los individuos analizados.

Teniendo en cuenta la composición genética y la frecuencia alélica entre controles y pacientes no se evidenciaron (Prueba de Student, $p < 0.05$) diferencias estadísticamente significativas.

Las variedades alélicas también implican que la forma más representada del gen de apoE entre los individuos analizados es el E3 (controles: 83,33 % y pacientes: 51,4%) y el menos representado el E2 (controles: 1,04 % y pacientes: 8,57%). En el caso del alelo 4 está mucho más presente en el caso de los pacientes (40 %) que en los controles (16 %) (Figura 12B). De manera global, encontramos que la toda la población presenta un 81,82% de E3, 15,45% de E4 y 2,73% de E2 (Figura 13). Estos resultados están en concordancia con otros estudios, en los que demuestran que la EA está estrechamente relacionada con una mayor frecuencia en relación al alelo 4 de apoE, ya que se ha demostrado que es un factor de alto riesgo. El E3 es la forma más común de dicho gen a nivel mundial y E2 se considera que tiene un efecto protector, por tanto podría no ser considerados como factor de riesgo (Kaya et al., 2015, p. 25).

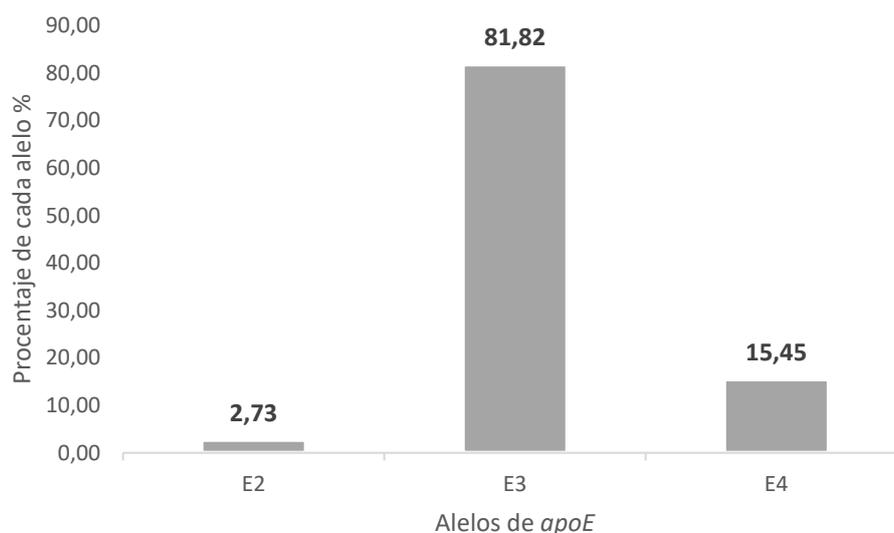


Figura 13. Distribución de las variedades alélicas encontradas en la población de estudio.

Los resultados muestran que el alelo E3 es el más frecuente seguido del E4 y una escasa presencia de E2, esto debido a que el genotipo con mayor presencia E3/E3. Por tanto dentro de la población de estudio como a nivel mundial E3 es el más abundante, en la población de estudio se encontró un 81,82% de presencia del alelo. Frecuencia elevada que se asemeja a lo encontrado en otros países como México (89,4%), Bogotá (85,2%) y Hungría (83,2%) mientras que en otras regiones dicha frecuencia es muy elevada alcanzando valores superiores al 90% (Perú, Brasil, Costa Rica, Corea). Es decir que a pesar de la diversidad genética existente en las diferentes regiones, se mantiene constante el elevado porcentaje de E3, por lo que es considerado como un alelo salvaje para la mayoría de poblaciones. Esto se debe a que es importante para la homeostasis lipídica, cumpliendo un papel determinante en la disminución de patologías que afecten el perfil lipídico como es el caso de la EA, por tanto aquellas poblaciones con frecuencias elevadas de E3, podrían presentar una menor predisposición a desarrollar enfermedades lipídicas (Angulo et al., 2015, p. 35 y Marca et al, 2011, p. 44).

En diferentes poblaciones al igual que en la de estudio, se reportan frecuencias bajas del alelo E2, tal es el caso de Brasil (1,8%), Colombia (1,8%), Perú (1,1%), entre otras. Pero a diferencia de lo que sucede con E3, existe una mayor diferencia entre poblaciones de las distintas regiones del mundo, en las cuales existen frecuencias un poco más elevadas de E2 como es el caso de Sudáfrica (19%), Dinamarca (12,7%) y Uganda (15%). No obstante, sigue siendo el alelo con menos frecuencia a nivel mundial en relación a los demás. Incluso existen localidades donde se encuentra ausente como por ejemplo Arabia Saudí y tribus indígenas de Venezuela y México. Aunque diversos estudios indican que E2 y E3 a futuro se pueden ver mayormente representados, gracias al constante avance en la mejora de la calidad de vida (Angulo et al., 2015, p. 37 y Marca et al., 2011, p. 40).

En cuanto al alelo E4 se encontró una porción considerable del grupo de estudio que lo presenta (15,45%). A nivel mundial varios estudios indican que su frecuencia es un poco más variable en relación a E2 y E3. Así se ha encontrado que algunas poblaciones de Brasil, Colombia, Pigmeos, Khoisan y Coreguaje presentan las frecuencias más altas en todo el mundo. Mientras que en poblaciones asiáticas como Corea, la India e Irán la presencia de dicho alelo es muy baja. Lo que indica que E4 se encuentra estrechamente relacionado al grupo poblacional y región en donde se sitúen (Velez et al., 2015, p. 12).

Además, se considera un factor de riesgo genético asociado con la aparición de la EA y con enfermedades cardiovasculares. Lo que concuerda con lo encontrado en este estudio, donde se tiene un elevado porcentaje de E4 en el grupo afectado por la EA (40%), en comparación con el grupo control (16%). Su participación en la EA, se debe a que causa hipercolesterolemia, que a su vez incrementa los niveles amiloideos (factor principal en el desencadenamiento de la EA) que afectan el estado cognitivo de las personas (Arango et al., 2014, p. 3 y Sadigh-Eteghad et al., 2012, p. 322).

5.5 Análisis de la frecuencia alélica

El análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas se realizó utilizando la fórmula de equilibrio de Hardy-Weinberg (Guo y Thompson, 1992; Hardy, 1908; Robertson y Hill, 1984 y Wright, 1931). Tanto los controles como los pacientes afectados con EA no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los métodos utilizados para establecer el equilibrio Hardy-Weinberg (H-W). De esta manera, se encontró que los controles y pacientes, no se encuentran en equilibrio de H-W. Los valores correspondientes al estadístico F_{IS} indican que existe un déficit de heterocigotos y por ende, el equilibrio se ve afectado (Tabla 11). Esto se puede atribuir principalmente, a que el tamaño de la muestra no es lo suficientemente grande. Aunque de acuerdo al principio de H-W, de no cumplirse el equilibrio, existirían fuerzas evolutivas presentes en la población analizada.

Tabla 11.

Valores del estadístico F_{IS} determinados por dos algoritmos distintos (Weir & Cockerham y Robertson & Hill) y empleando diferentes hipótesis alternativas (H_1). En todos los casos la hipótesis nula (H_0) fue que el locus se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Método	Poblaciones	F_{IS}		Valor P	F_{ST}
		W Y C	R Y H		
Método de las cadenas de Markov del P exacto	Controles	0,0268	0,0171	0,6116	0,148
	Pacientes	0,1969	0,116	0,2649	
H1=Deficiencia de la heterocigosidad	Controles	0,0268	0,0171	0,5545	
	Pacientes	0,1969	0,116	0,1331	
H1=Exceso de heterocigosidad	Controles	0,0268	0,0171	0,8051	
	Pacientes	0,1969	0,116	0,9006	

El valor correspondiente al F_{ST} , determinado por un ANOVA estándar (Weir y Cockerham, 1984) fue igual a 0.1480 (Tabla 11), lo que indica una gran

diferenciación genética entre los controles y los pacientes afectados con EA (Ye, Wu y Li, 2015, p. 122).

El número esperado de heterocigotos/homocigotos fue determinado de acuerdo a la corrección de Levene (Levene, 1949) (Tabla 12).

Tabla 12.

Relación entre el número esperado y observado de heterocigotos/homocigotos en los controles y los pacientes afectados por EA.

Datos básicos del locus	Controles	Pacientes
Homocigotos esperados	65,59	16,86
Homocigotos observados	66,00	20,00
Heterocigotos esperados	15,41	16,13
Heterocigotos observados	15,00	13,00

La relación entre los genotipos que se observaron en cada una de las muestras poblacionales evaluadas indica que no hay diferencias significativas entre estos dos valores (Tabla 13).

Tabla 13.

Relación entre el número de individuos esperados/observados en cada uno de los genotipos para los controles y los pacientes afectados con EA.

Población	Genotipos	Obs.	Esperados
Controles	2,2	0	0
	3,2	1	0,9006
	3,3	65	64,8447
	4,2	0	0,0994
	4,3	14	14,4099
	4,4	1	0,7453
Pacientes	2,2	0	0,0462
	3,2	3	1,9846
	3,3	15	13,8923
	4,2	0	0,9231
	4,3	10	13,2308
	4,4	5	2,9231

Las frecuencias de cada uno de alelos evaluados corroboran que el alelo más representativo en los pacientes fue el E3 (0.6515) seguido del E4 (0.303), y el menos representado es el E2. De forma semejante ocurre en los controles con la diferencia de que hay mayor representación de E3 (0.8951). De igual manera, los valores correspondientes al estadístico F_{IS} se encuentran cercanos a cero, como se determinó en las pruebas de equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 14).

Tabla 14.

Relación de los datos básicos del locus apoE en relación a la frecuencia alélica y los valores del estadístico F_{IS} .

Alelo	Número de individuos		Frecuencia		Controles	Pacientes
	Controles	Pacientes	Controles	Pacientes	Fis WyC	Fis WyC
2	1	3	0,0062	0,0455	0	-0,0323
3	145	43	0,8951	0,6515	0,0204	0,1475
4	16	20	0,09888	0,303	0,0353	0,2967
Total	162	66			0,0268	0,1969

También se realizó un análisis preliminar en relación a la estructura de la población. El análisis correspondiente de acuerdo al método de Evanno (Evanno et al., 2005, p. 6) implicó que el número más probables de clústeres en los que se divide el total de la muestra poblacional evaluada fue igual a 3 (Figura 14).

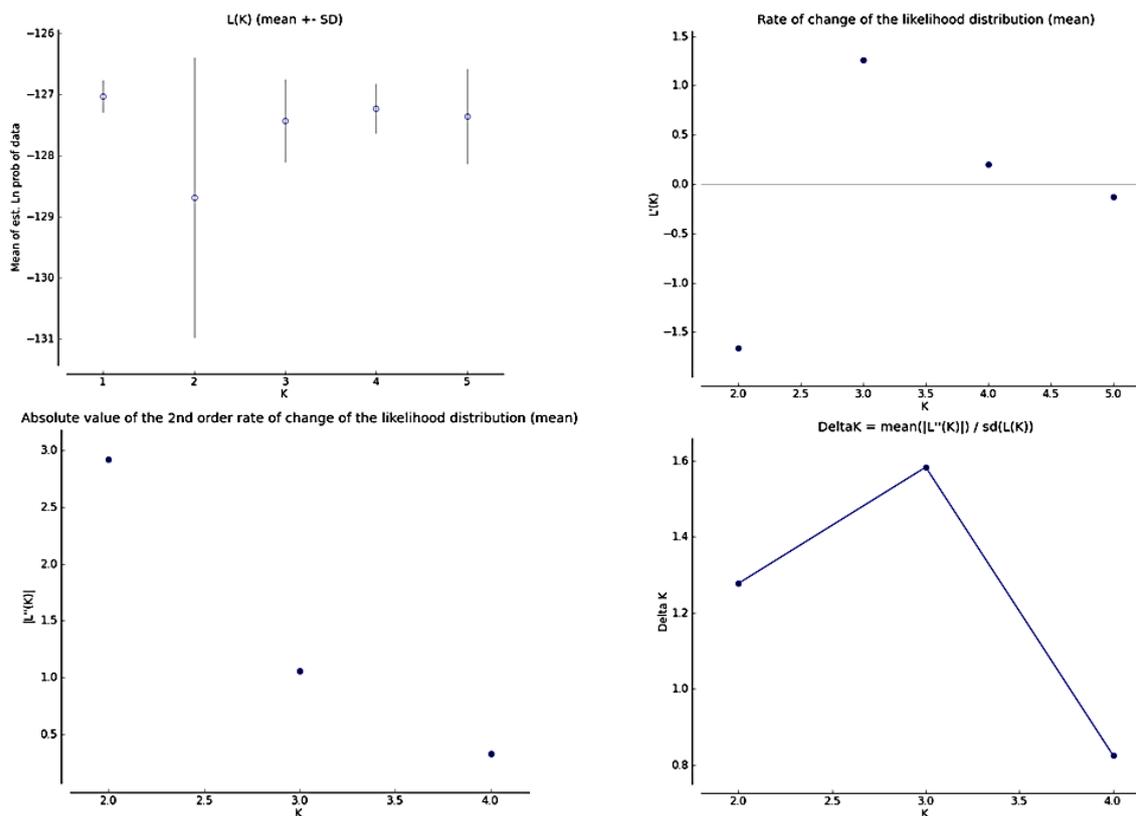


Figura 14. Determinación del número de clústeres más probables de la muestra poblacional conformada por los pacientes afectados con la EA y los controles correspondientes.

A) El número más probable de clústeres es igual a 3.

Aunque estos resultados indican que la población analizada se divide en tres clústeres, es importante señalar que en este estudio sólo se evaluó un locus de los asociados a la enfermedad. La determinación de las posibilidades alélicas en relación a otros genes involucrados con la EA, pudieran estar asociados a un resultado más confiable en relación a la estructuración de la población de los pacientes afectados por este padecimiento (Jun, 2010; Lambert, 2013 y Levy-lahad et al., 1995, p. 34).

5.5.1 Análisis del riesgo de cada alelo del gen *apoE*

El valor correspondiente al *Odds Ratio* para representar el riesgo de que conlleva cada alelo de *apoE* en el desarrollo de la EA, se evaluó con un intervalo de confianza de un 95%. Si los individuos presentaban o no cada alelo y se lo asocio a si presentaba la enfermedad (Tabla 15). Así se encontró que aquellos individuos que poseen el alelo E2, tienen hasta 15 veces más probabilidad de desarrollar la enfermedad, mientras los que poseen el E3 son menos propensos. Existiendo significancia en la estimación del riesgo de todos los alelos ($p < 0.05$).

Tabla 15.

Estimación del Odds Ratio para cada alelo.

Alelo	Odds Ratio	IC de 95%	Valor P
E2	15	1,675-134,354	0,002
E3	0,067	0,007-0,0597	0,002
E4	3,081	1,242-7,642	0,013

El polimorfismo de *apoE* en un factor de riesgo muy importante en el desarrollo de la EA y dependiendo el alelo el peligro puede aumentar o disminuir. De acuerdo a lo obtenido en la población de estudiada, se tiene que E2 en este caso podría representar un elemento que incrementa considerablemente la probabilidad de que se presente la EA. Sin embargo, varios estudios indican que dicho alelo se asocia mayormente con una disminución de riesgo y se ha llegado a considerar que tiene un efecto protector. A pesar de la ayuda que puede llegar a brindar la presencia del alelo E2, la EA aunque con menor probabilidad se puede desarrollar en los individuos que lo presenten (Rasmussen et al., 2016, p. 5).

De acuerdo a lo expuesto se tiene que E2 es el factor con mayor riesgo, contradictoriamente a lo encontrado en varios estudios donde encontraron que la influencia que tiene E2 en la EA es mínima (Suri et al., 2013, p. 80). Esto se puede deber a que el tamaño de la muestra no es lo suficientemente grande y a que no se llegó a un equilibrio entre el número de individuos pertenecientes al grupo de pacientes y el grupo control. Además, que el E2 fue el alelo con la frecuencia más baja dentro de la población, siendo más frecuente en el grupo de pacientes, por esta razón al tener un tamaño de muestra relativamente pequeño junto con la elevada presencia de E2 dentro de los pacientes. El riesgo parecería que es mucho más elevado para dicho alelo, lo que no necesariamente podría ser así pero en este estudio se encontró que podría ser un factor de alto impacto en cuanto al desarrollo de la EA, por lo que E2 no tendría el efecto protector que presenta en otras poblaciones del mundo.

En menor medida pero con gran impacto, se encontró que E4 incrementa hasta 3 veces más el riesgo a desarrollar la EA, por tanto tiene una importante participación en el desarrollo de la patología. Lo que concuerda con lo previamente expuesto, donde se tiene que la mayor frecuencia de E4 se presenta en el grupo de pacientes. También está en relación con lo reportado en otros estudios, los cuales indican que E4 aumenta ampliamente el riesgo a padecer la EA, pues se presenta en diferentes poblaciones afectadas (Donix et al., 2012, p. 310).

APOE4 es considerado como el mayor factor de riesgo de la EA, quienes lo poseen aumentan dramáticamente la probabilidad de desarrollar la patología tempranamente. Debido a que es mucho menos eficiente que el resto de isoformas para equilibrar el flujo de lípidos. Lo que implica que la función sináptica se vea afectada, producto de la neuroinflamación y disfunción neurovascular que se produce, generando problemas en las funciones cognitivas del cerebro. Además, quienes portan dicho alelo tiene un incremento en la expresión de supresores tumorales y reguladores del crecimiento celular, lo que

conduce a un incremento de la apoptosis (Herrera et al., 2010, p. 66). Estos daños sugieren que E4 se asocia a diversas patologías de los sistemas vasculares del cerebro, jugando un papel importante en la patogénesis de la EA (Liu et al., 2013, p. 7).

Este estudio brinda una aproximación de la manera de cómo se comporta y se distribuyen los polimorfismos del gen *apoE* en la población de la sierra ecuatoriana. Aportando información de gran utilidad para estudios de variabilidad genética y prevalencia de la EA principalmente, así como su posible relación con otros genes y diversos factores que existen en nuestro medio.

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

El genotipo E3/E3 es el más prevalente en la población estudiada, lo que concuerda con lo observado en otras poblaciones a nivel mundial y sugiere además, que el mismo posee una prevalencia elevada independientemente de la variabilidad geográfica y étnica existente.

La población estudiada no se encuentra en el equilibrio de Hardy-Weinberg de acuerdo a los valores obtenidos, esto refleja que existen factores externos a la enfermedad que están influyendo en la misma.

Los resultados obtenidos en relación al alelo E2, sugieren que la población de la sierra ecuatoriana portadora del mismo, podría tener mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, puesto que no se observó el efecto protector reportado en la bibliografía.

Lo reportado en relación al alelo E4, podría indicar que la población de la sierra ecuatoriana portadora del mismo, pudiera estar expuesta a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer a edades más avanzadas, al igual que lo descrito a nivel mundial.

Los reportes obtenidos en relación al alelo E3, denotan que el mismo no representa un factor de riesgo de desarrollo de Alzheimer en la población estudiada, lo que concuerda con lo descrito con varias poblaciones a nivel mundial.

6.2 Recomendaciones

Se recomienda en futuros estudios, incrementar el número de individuos evaluados para que la muestra poblacional sea más representativa y pueda tener una estadística con mayor variación y robustez. Así como incluir personas pertenecientes al resto de regiones del Ecuador (costa, sierra y oriente), Además, de incluir más variables como el colesterol y enfocarse en un rango más limitado de edad, debido a que son factores determinantes en el desarrollo de la EA.

También se sugiere hacer un periodo de seguimiento más extenso que permita identificar otros factores medio ambientales que puedan influir. Como son los eventos estresantes, fármacos ingeridos y otras enfermedades que puedan tener relación alguna con la patología.

Referencias

- Armstrong, R. (2013). *Review article What causes alzheimer's disease*. Recuperado el 05 de noviembre de 2016 de <http://www.termedia.pl/doi/10.5114/fn.2013.37702>
- Allegri, R. (2010). Enfermedad de Alzheimer. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de [http://dx.doi.org/10.1016/S1853-0028\(11\)70026-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1853-0028(11)70026-X)
- Alzheimer's Association. (2015). *2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures Includes a Special Report on Disclosing a Diagnosis of Alzheimer's Disease*. Recuperado el 22 de marzo de 2016 de https://www.alz.org/facts/downloads/facts_figures_2015.pdf
- Alzheimer Association. (2008). *2008 Alzheimer ' s disease facts and figures*. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552-5260\(08\)00033-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552-5260(08)00033-2)
- Angulo, M., Esteban, L., Urbano, P., Hincapié, E. y Núñez, L. (2015). Análisis del polimorfismo de APOE en la población de Barranquilla, Colombia. Recuperado el 18 de octubre de 2016 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572016000100006
- Aprahamian, I., Stella, F., y Forlenza, V. (2013). *New treatment strategies for Alzheimer ' s disease : is there a hope*. Recuperado el 03 de marzo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868059/?report=reader>
- Arango Viana, C., Valencia, V., Páez, L., Montoya, N., Palacio, C., Arbeláez, P. y García, J. (2014). *Prevalence of Variants in the Apolipoprotein E (APOE) Gene in a General Population of Adults from an Urban Area of Medellín (Antioquia)*. Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74502014000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=es

- Bassil, N. (2012). *Diagnosis and Clinical Features*. Recuperado el 03 de marzo de 2016 de <http://www.lebanesemedicaljournal.org/lmj/2013/06/11/alzheimers-dementia-a-brief-review/>
- Bermejo, F., Llamas, S. y Villarejo, A. (2016). Prevención de la enfermedad de Alzheimer : un camino a seguir. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2016.05.010>
- Cacabelos, R. (2001). Enfermedad de alzheimer. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=80630401>
- CADIME. (2014). Enfermedad de Alzheimer: Tratamiento farmacológico. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de http://www.cadime.es/es/boletin_terapeutico_andaluz.cfm?bid=175#.VRrzWeN5M-U
- Carmona, J. (2012). Análisis de factores psicosociales en pacientes con enfermedad de Alzheimer: tarifa social, salud percibida y calidad de vida. Recuperado el 03 de marzo de 2016 de <http://dspace.ceu.es/bitstream/10637/5582/1/Carmona%20Simarro,%20Jos%C3%A9%20Vicente.pdf>
- Carrillo, C., Rowe, C., Szoeke, C., Masters, C., Ames, D., Meara, T., y Head, R. (2013). *Research and standardization in Alzheimer ' s trials : Reaching international consensus*. Recuperado el 03 de marzo de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.10.006>
- Castellani, R., Moreira, P., Zhu, X. y Perry, G. (2014). *Alzheimer's Disease: Pathology and Pathogenesis*. Recuperado el 03 de abril de 2016 de <http://www.cdc.gov/aging/aginginfo/alzheimers.htm>
- Científica, P. (2010). Especial Alzhéimer. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://www.investigacionyciencia.es/revistas/mente-y-cerebro/numero/68/el-hallazgo-de-alzheimer-12388>
- Crowther, R. y Goedert, M. (2000). *Abnormal Tau-Containing Filaments in*

Neurodegenerative Diseases. Recuperado el 10 de marzo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1047847700942709?via%3Dihub>

Donix, M., Small, G. y Bookheimer, S. (2012). *Family History and APOE-4 Genetic Risk in Alzheimer ' s Disease*. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3797601/>

Duthey, B. (2013). *Alzheimer Disease and other Dementias*. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/BP6_11Alzheimer.pdf

Earl, D., y VonHoldt, B. (2012). *STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>

Emi, M., Wu, L., Robertson, M., Myers, L., Hegele, A., Williams, R., y Lalouel, J. (1988). *Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms*. Recuperado el 17 de noviembre de 2016 de [http://doi.org/10.1016/0888-7543\(88\)90130-9](http://doi.org/10.1016/0888-7543(88)90130-9)

Espinosa del Pozo, P., Espinosa, S., Garzon, Y., Velez, R., Batallas, E., Basantes, A., y Smith, C. (2012). Factores de riesgo y prevalencia de la demencia y enfermedad de Alzheimer en Pichincha – Ecuador. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/256293953_FACTORES_DE_RIESGO_Y_PREVALENCIA_DE_LA_DEMENCIA_Y_ENFERMEDAD_DE_ALZHEIMER_EN_PICHINCHA-ECUADOR_ESTUDIO_FARYPDEA

Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). *Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study*. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J. K., Stephens, M., Kidd, M., y Suerbaum, S. (2003). *Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1126/science.1080857>
- Fratiglioni, L., Grut, M., Forsell, Y., Viitanen, M., Grafström, M., Holmén, K. y Winblad, B. (1991). *Prevalence of Alzheimer's disease and other dementias in an elderly urban population: relationship with age, sex, and education*. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://doi.org/10.1212/WNL.41.12.1886>
- Fundación TASE. (2015). Alzheimer y Demencia en el Ecuador. Recuperado el 27 de octubre de 2016 de <http://www.fundaciontase.org/blog1>.
- Gao, S., Hendrie, H., Hall, K., Hui, S. y DO, S. (1998). *The Relationships Between Age, Sex, and the Incidence of Dementia and Alzheimer Disease*. Recuperado el 17 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1001/archpsyc.55.9.809>
- Garcia, A. (2003). La apolipoproteína E: el polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos, los hábitos alimenticios y el origen étnico. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcca/v10n4/10n4a3.pdf>
- Giacobini, E. y Gold, G. (2013). *Alzheimer disease therapy moving from amyloid β to tau*. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2013.223>
- Guo, S. y Thompson, E. A. (1992). *Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles*. Recuperado el 17 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.2307/2532296>
- Hardy, G. (1908). *Mendelian Proportions in a Mixed Population*. Recuperado el 27 de octubre de 2016 de <http://doi.org/10.1126/science.28.706.49>
- Hendrix, A., Finger, B., Weiner, M., Frisoni, G., Iwatsubo, T., Rowe, C. y Carrillo, M. (2015). *The Worldwide Alzheimer ' s Disease Neuroimaging*

Initiative. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2015.05.008>

Herrera, M., Hernández, M., Manzo, J. y Aranda, G. (2010). Enfermedad de Alzheimer : inmunidad y diagnóstico. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <http://www.neurologia.com/articulo/2009531>

Hu, P., Qin, Y. H., Lei, F. Y., Pei, J., Hu, B. y Lu, L. (2011). *Variable frequencies of apolipoprotein E genotypes and its effect on serum lipids in the Guangxi Zhuang and Han children*. *International Journal of Molecular*. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://doi.org/10.3390/ijms12095604>

Jun, G. (2010). *Meta-analysis Confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer Disease Risk Loci and Reveals Interactions With APOE Genotypes*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1001/archneurol.2010.201>

Kanekiyo, T., Xu, H. y Bu, G. (2014). *ApoE in Alzheimer's disease: Accidental encounters or partner*. Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.045>

Kaya, G., Gündüz, E., Acar, M., Hatipoğlu, Ö., Acar, B., İlhan, A. y Gündüz, M. (2015). *Turkish Journal of Medical Sciences Potential genetic biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer disease: APOE and BIN1*. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://journals.tubitak.gov.tr/medical/issues/sag-15-45-5/sag-45-5-12-1405-96.pdf>

Korolev, I. (2014). *Alzheimer ' s Disease : A Clinical and Basic Science Review*. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://msrj.chm.msu.edu/wp-content/uploads/2014/12/Fall-2014-Alzheimers-Disease.pdf>

Kumar, A., Singh, A. y Ekavali. (2015). *A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update*. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1734114014002886>

- Lambert, J. (2013). *Meta-Analysis of 74,046 Individuals Identifies 11 New Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1093/hmg/7.3.533>
- Levy-lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D., Oshima, J., Pettingell, W. y Tanzi, R. (1995). *Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer ' s Disease Locus*. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://doi.org/10.1126/science.7638622>
- Liu, C., Kanekiyo, T., Xu, H. y Bu, G. (2013). *Apolipoprotein E and Alzheimer disease : risk , mechanisms and therapy*. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>
- Loy, C., Schofield, P., Turner, A. y Kwok, J. (2014). *Genetics of dementia*. Recuperado el 05 de noviembre de 2016 de <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613606303>
- Marca, V., Acosta, O., Cornejo, M., Huerta, D. y Mazzetti, P. (2011). *Genetic Polymorphism of Apolipoprotein E in Peruvian Population*. Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a03v28n4>
- Mart, M. (2009). Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer: definición, significación diagnóstica y utilidad clínica. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de http://www.viguera.com/sepg/pdf/revista/0102/0102_101_114.pdf
- Masters, C., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C., Sperling, R. y Cummings, J. (2015). *Alzheimer's disease*. Recuperado el 03 de abril de 2016 de http://www.viguera.com/sepg/pdf/revista/0102/0102_101_114.pdf
- Medina, M. y Avila, J. (2014). *New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease*. Recuperado el 15 de abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.013>
- Molero, A., Pino, G. y Maestre, G. (2001). *Modulation by age and gender of risk for Alzheimer ' s disease and vascular dementia associated with the*

apolipoprotein E- 1 4 allele in Latin Americans. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/54/107>

Namboori, P., Vineeth, K., Rohith, V., Hassan, I., Sekhar, L., Sekhar, A. y Nidheesh, M. (2011). *The ApoE gene of Alzheimer's disease (AD)*. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://doi.org/10.1007/s10142-011-0238-z>

Paz-y-Miño, C. y García, J. (2015). *Alzheimer's Disease in Latin America and Caribe*. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://www.smgebooks.com/alzheimers-disease/chapters/ALZD-15-02.pdf>

Pilotto, A., Padovani, A. y Borroni, B. (2013). *Clinical, biological, and imaging features of monogenic Alzheimer's Disease*. Recuperado el 05 de noviembre de 2016 de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3860086&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Pritchard, J., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000). *Inference of population structure using multilocus genotype data*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1461096/>

Rasmussen, K., Tybjærg, A. y Nordestgaard, B. (2016). *Plasma levels of apolipoprotein E and risk of ischemic heart disease in the general population*. Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.038>

Raymond, M. y Rousset, F. (1995). *GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573>

Ridge, P., Ebbert, M. y Kauwe, J. (2013). *Genetics of Alzheimer Disease*.

Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://jgp.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0891988710383571>

Riedel, B., Thompson, P. y Brinton, R. (2016). *Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease*. Recuperado el 15 de abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.012>

Rizzi, L., Rosset, I. y Roriz, M. (2014). *Global Epidemiology of Dementia: Alzheimer's and Vascular Types*. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jsbmb.2016.03.012>

Robertson, A. y Hill, W. (1984). *Deviations from Hardy-Weinberg proportions: Sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients*. Recuperado el 17 de noviembre de 2016 de <http://www.genetics.org/content/107/4/703.abstract>

Rodríguez, J. y Gutiérrez, R. (2014). Demencias y enfermedad de Alzheimer en América Latina y el Caribe. Recuperado el 15 de abril de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=21431356008>

Rosenberg, N., Burke, T., Elo, K., Feldman, M., Freidlin, P., Groenen, M., y Weigend, S. (2001). *Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1461842/pdf/11606545.pdf>

Rousset, F. (2008). *Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux*. Recuperado el 15 de abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>

Sadigh-Eteghad, S., Talebi, M. y Farhoudi, M. (2012). *Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with sporadic late onset Alzheimer's disease*. Recuperado el 15 de abril de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022896>

Selkoe, D. (1997). *Alzheimer's Disease-Genotypes, Phenotype, and Treatments*.

Recuperado el 23 de abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1126/science.275.5300.630>

- Sibener, L., Zaganjor, I., Snyder, H., Bain, L., Egge, R. y Carrillo, M. (2014). *Alzheimer's Disease prevalence , costs , and prevention for military personnel and veterans*. Recuperado el 11 de julio de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2014.04.011>
- Singh, P., Naz, I., Gilmour, A., Singh, M. y Mastana, S. (2006). *Association of APOE (Hha1) and ACE (I/D) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in North West India*. Recuperado el 17 de mayo de 2016 de doi: 10.1016/j.diabres.2006.03.013
- Snyder, H., Cardenas, C., Alonso, A., Bain, L., Iqbal, K. y Carrillo, M. (2016). *Alzheimer's disease research in Ibero America*. Recuperado el 09 de abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.04.007>
- Sosa, A., Acosta, I. y Prince, M. (2012). *Epidemiology of Dementias and Alzheimer's Disease*. Recuperado el 02 de mayo de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001170>
- Spillantini, G. y Goedert, M. (2013). *Tau pathology and neurodegeneration*. Recuperado el 13 de mayo de 2016 de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3079615&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Suri, S., Heise, V., Trachtenberg, A. y Mackay, C. (2013). *The forgotten APOE allele : A review of the evidence and suggested mechanisms for the protective effect of APOE*. Recuperado el 11 de mayo de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.10.010>
- Tuminello, E. y Han, S. (2011). *The Apolipoprotein E Antagonistic Pleiotropy Hypothesis : Review and Recommendations*. Recuperado el 13 de abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.4061/2011/726197>
- Velez, C., Rojas, W., Jimenez, M. y Bedoya, G. (2015). *Distribution of APOE polymorphism in the "Paisa" population from northwest Colombia*

(Antioquia). Recuperado el 25 de marzo de 2016 de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84920040578&partnerID=tZOtx3y1>

Villegas, S. (2015). Enfermedad de Alzheimer: nuevas estrategias terapéuticas. Recuperado el 13 de agosto de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2014.05.023>

Wang, F., Zhu, Y., Huang, Y., McAvoy, S., Johnson, W., Cheung, T. y Smith, D. (2005). *Transcriptional repression of WEE1 by Kruppel-like factor 2 is involved in DNA damage-induced apoptosis*. Recuperado el 24 de agosto de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1261/rna.876308.802>

Weiner, M., Veitch, D., Aisen, P., Beckett, L., Cairns, N., Green, R. y Trojanowski, J. (2013). *The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A review of papers published since its inception*. Recuperado el 13 de abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2013.05.1769>

Weir, B. y Cockerham, C. (1984). *Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure*. Recuperado el 13 de abril de 2016 de <http://dx.doi.org/10.2307/2408641>

Wright, S. (1931). *Evolution in Mendelian Populations*. Recuperado el 12 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1201091/pdf/97.pdf>

Ye, Y., Wu, C. y Li, J. (2015). *Genetic population structure of Macridiscus multifarius (mollusca: Bivalvia) on the basis of mitochondrial markers: Strong population structure in a species with a short planktonic larval stage*. Recuperado el 11 de marzo de 2016 de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0146260>

Zhang, L., Chang, R., Chu, L. y Mak, H. (2012). *Current neuroimaging techniques in Alzheimer's disease and applications in animal models*. Recuperado el 13 de noviembre de 2016 de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3477739&t>

Anexos

Anexo 1. Consentimiento informado



Instituto de Investigaciones Biomédicas

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS
Laureate International Universities

Título de proyecto: *Identificación de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer en el Ecuador*

PARTE A

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia en las personas mayores a 65 años. Su incidencia aumenta alarmantemente cada año. Este desorden se caracteriza por una pérdida sutil de la memoria que va progresando hasta llegar a ser incapacitante. Otros síntomas incluyen confusión, problemas de lenguaje, alucinaciones, entre otros. Este desorden se debe a la acumulación de placas seniles y la formación de ovillos neurofibrilares que se acumulan en el cerebro. Estas placas se creen que generan respuestas inflamatorias, muerte celular y declinación cognitiva. El diagnóstico temprano de esta enfermedad ayudaría a dar un mejor pronóstico. Las técnicas usadas hasta ahora por un lado son costosas o invasivas. Es por esto que estamos tratando de identificar marcadores de la enfermedad que se encuentran en la sangre y se llaman miARNs. Su colaboración es importante para este estudio, a través de una muestra de sangre periférica (5ml) y una punción en el dedo podremos investigar e identificar estos biomarcadores. Toda información obtenida en el estudio será mantenida en estricta confidencialidad. Los participantes pueden formular las interrogantes que sean necesarias para esclarecer cualquier duda respecto a la investigación.

Por favor
marque
con una X

Usted puede retirar su participación en este estudio en cualquier momento.

1. Confirmando que he leído y comprendido la información, y he tenido la oportunidad de hacer preguntas; que estoy de acuerdo para no restringir el uso de los datos generados usando mis muestras. De igual forma, confirmo que he comprendido que toda mi información personal será tratada de manera confidencial y no podrá revelarse bajo ninguna circunstancia.

2. Estoy dispuesta/o a participar en este estudio, sobre la base de la información que me han dado y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

Firma del voluntario:

Fecha :

Nombre del voluntario:

Anexo 2. Concentración de las muestras de ADN.

Código IIB	[] ng/μL	Abs. 260/280	Código IIB	[] ng/μL	Abs. 260/280
SAD002-A	57,7	1,86	SAD058-B	50,5	1,91
SAD003-A	44,7	1,9	SAD059-A	45,3	1,97
SAD004-A	55,7	1,87	SAD061-B	75,9	1,95
SAD005-A	54,2	1,84	SAD062-A	48,3	1,86
SAD006-A	45,2	1,87	SAD063-A	47,4	1,9
SAD007-A	68,6	1,88	SAD065-B	106,7	1,87
SAD008-A	116,9	1,84	SAD066-B	122,1	1,78
SAD009-A	85,9	1,8	SAD067-A	138	1,73
SAD010-A	87,5	1,91	SAD069-A	46,9	1,9
SAD011-A	154,3	1,89	SAD070-A	98,9	1,84
SAD012-A	107,1	1,71	SAD071-A	79,6	1,94
SAD013-A	132,9	1,9	SAD072-A	71,1	1,97
SAD014	8,8	1,38	SAD073-A	117,1	1,84
SAD015-A	54,3	1,87	SAD074-A	72,1	1,92
SAD016-B	16,1	2,1	SAD075-A	56,5	1,78

SAD017-B	16	1,81	SAD076-A	80,6	1,87
SAD018-B	52,3	1,9	SAD077-A	106,3	1,88
SAD019-B	78,1	1,81	SAD078-A	74	1,86
SAD020-A	61,9	1,92	SAD079	46,5	2,02
SAD021	127,2	1,74	SAD080	56,1	2
SAD022	52,7	1,98	SAD081	75,9	1,89
SAD023-A	28,2	1,98	SAD082	93,7	1,85
SAD024-A	69,6	1,89	SAD083	136,3	1,94
SAD025-A	75,1	1,87	SAD084	75,2	1,96
SAD026-A	55,9	1,88	SAD085	68,7	2,05
SAD027	80,9	1,92	SAD086	81,3	1,96
SAD028	32,3	2	SAD087	69,9	1,96
SAD029-A	88,9	1,63	SAD088	71,9	1,97
SAD030	51,9	1,93	SAD089	62,7	1,98
SAD031	16,3	2,04	SAD090	91,7	1,88
SAD032	43	1,87	SAD091	99,4	2,01
SAD033	62,9	1,82	SAD092	86,7	1,99
SAD034-A	71,9	1,87	SAD093	92,3	1,97
SAD035	75,1	1,9	SAD094	91,3	1,95
SAD036	81,4	1,88	SAD095	107	1,89
SAD037	93,2	1,91	SAD096	68,5	1,92
SAD038	68,4	1,87	SAD097	85,8	1,95
SAD039-A	50,2	1,82	SAD098	61,7	1,87
SAD040	36,4	2	SAD099	64	1,95
SAD041	56,2	1,96	SAD100	80,5	1,96
SAD042	55,5	1,93	SAD101	98,6	1,9
SAD043	84,4	1,89	SAD102	76,1	1,91
SAD044	56,5	1,94	SAD103	66	1,9
SAD045	94,2	1,86	SAD104	64	1,87
SAD046	39,8	1,86	SAD105	36,3	1,97
SAD047	46,7	1,96	SAD106	84,6	1,81

SAD048-A	50,8	2	SAD107	74,2	1,96
SAD049-A	53,7	2,02	SAD108	13,4	1,68
SAD050-A	76,3	1,92	SAD109	59,9	1,81
SAD051-A	39,2	1,81	SAD110	84,4	1,78
SAD053-A	70,3	1,95	SAD111	118	1,89
SAD054-A	19,9	1,72	SAD112	68,2	1,9
SAD055-A	34,8	1,92	SAD113	44,8	1,96
SAD056-A	74,9	1,83	SAD114	42,2	2,02
SAD057-A	98,2	1,95	SAD115	74,5	1,96

Anexo 3. Identificación de los RFLPs de cada muestra.

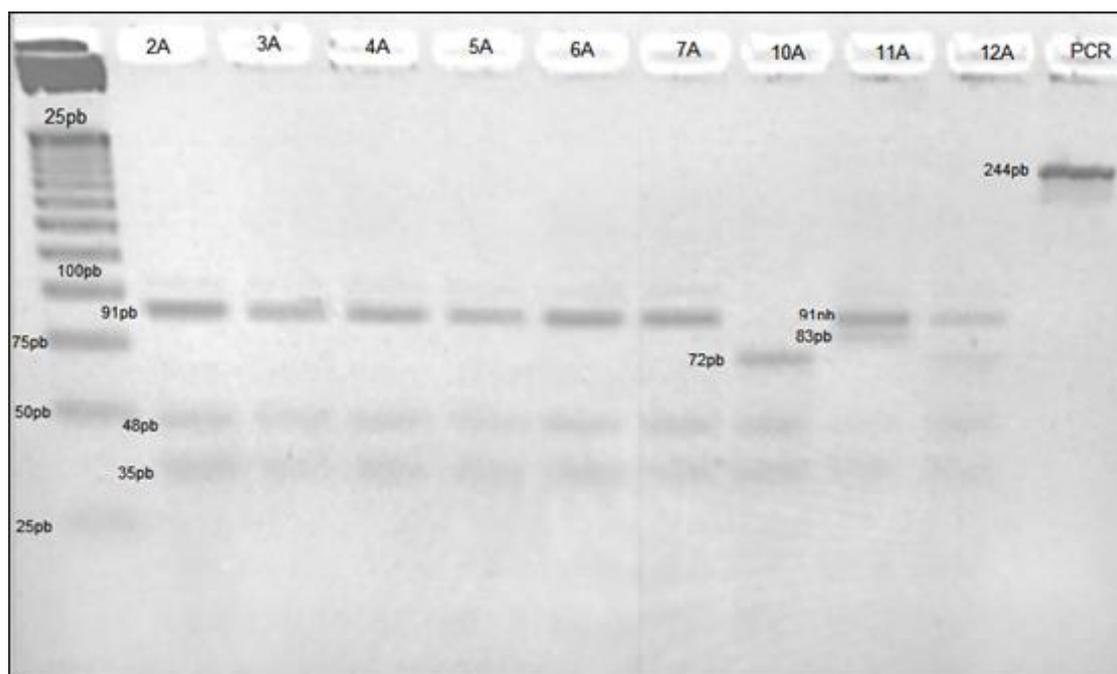


Figura 15. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*.

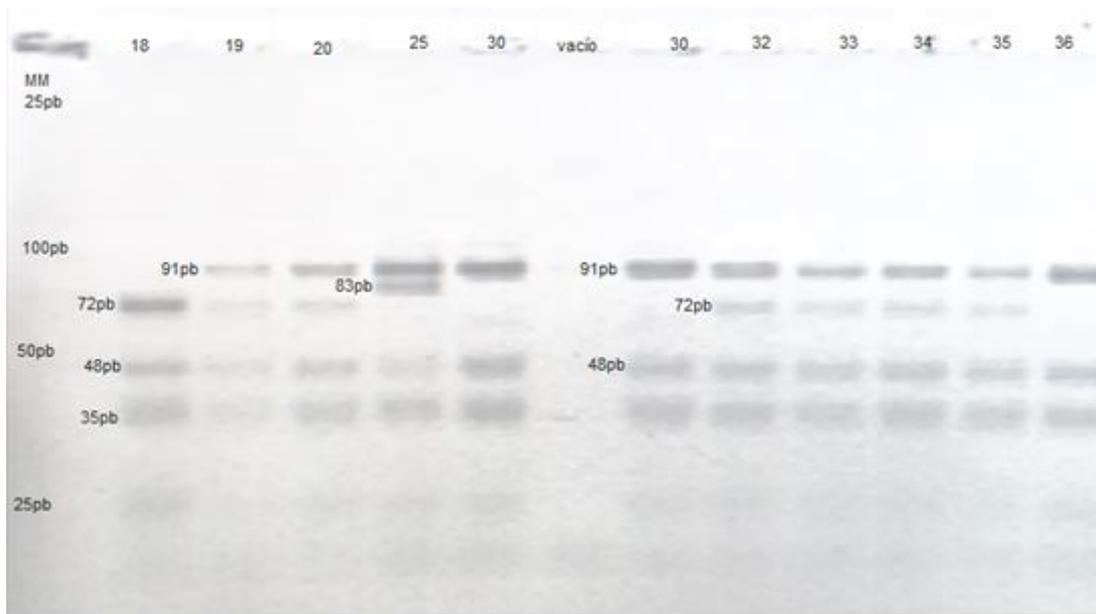


Figura 16. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*.

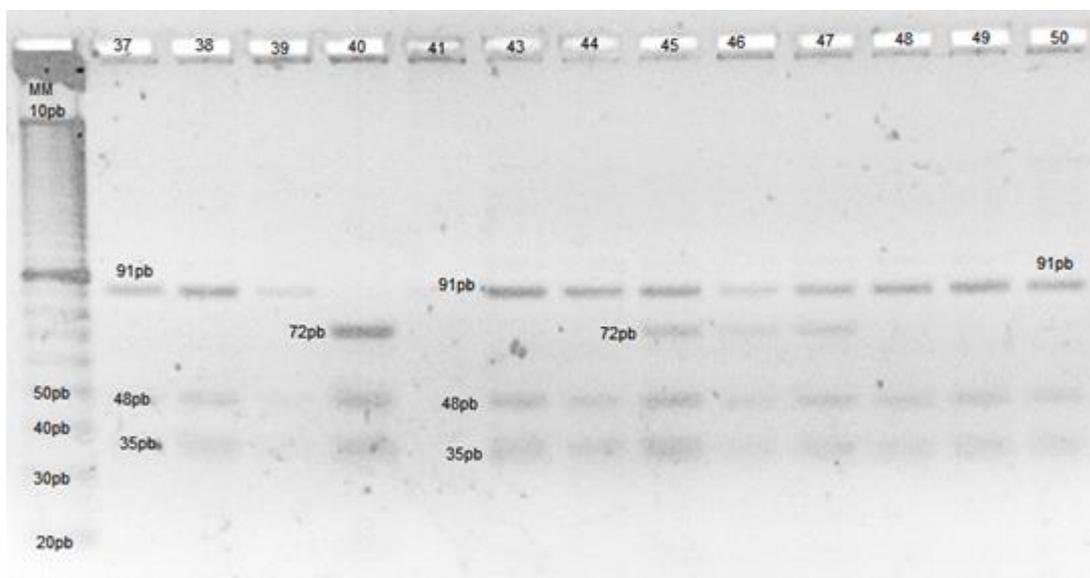


Figura 16. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*.

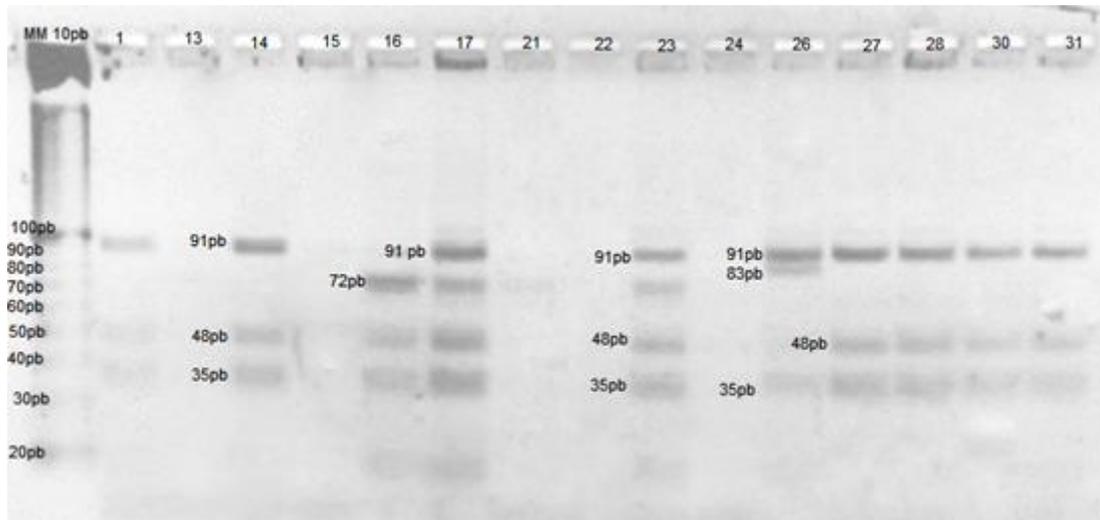


Figura 17. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*.

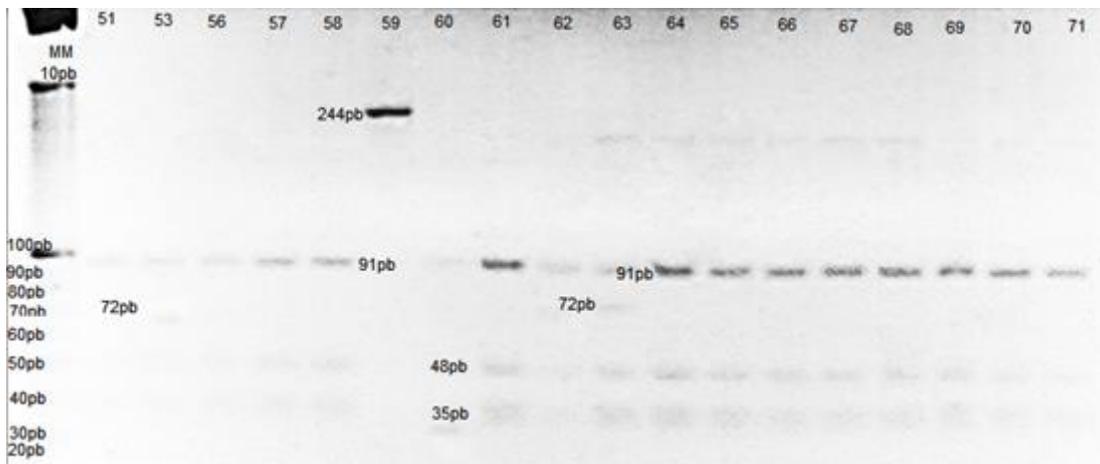


Figura 18. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*.

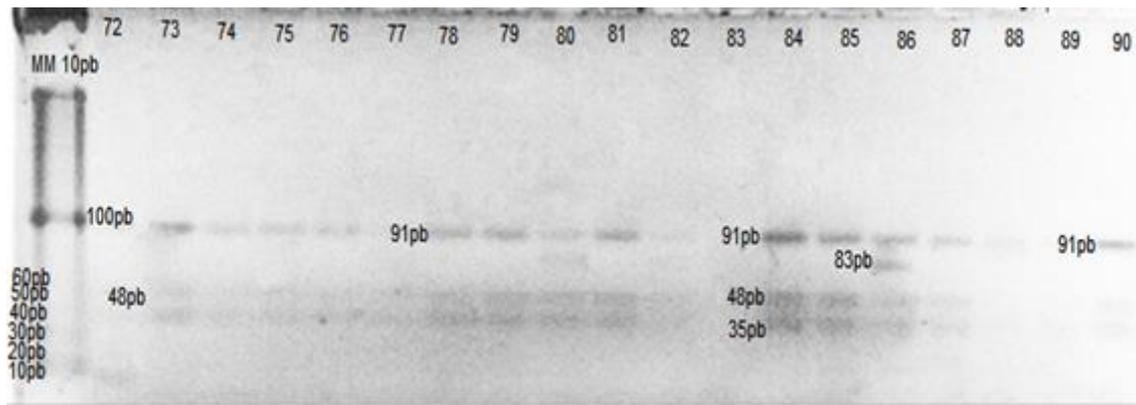


Figura 19. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*.

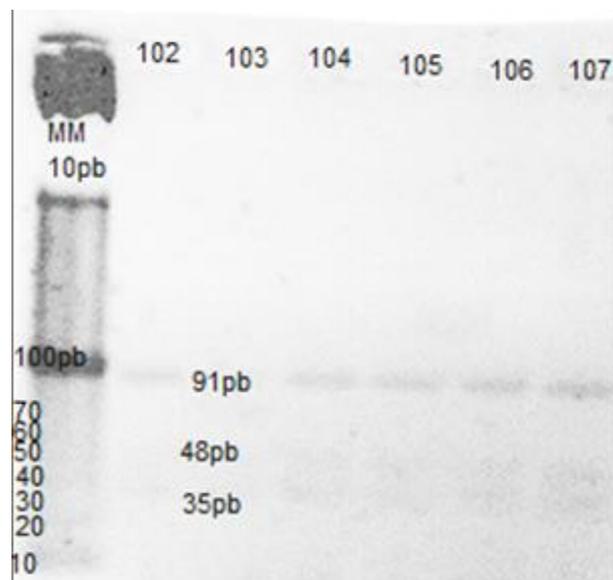


Figura 20. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*.

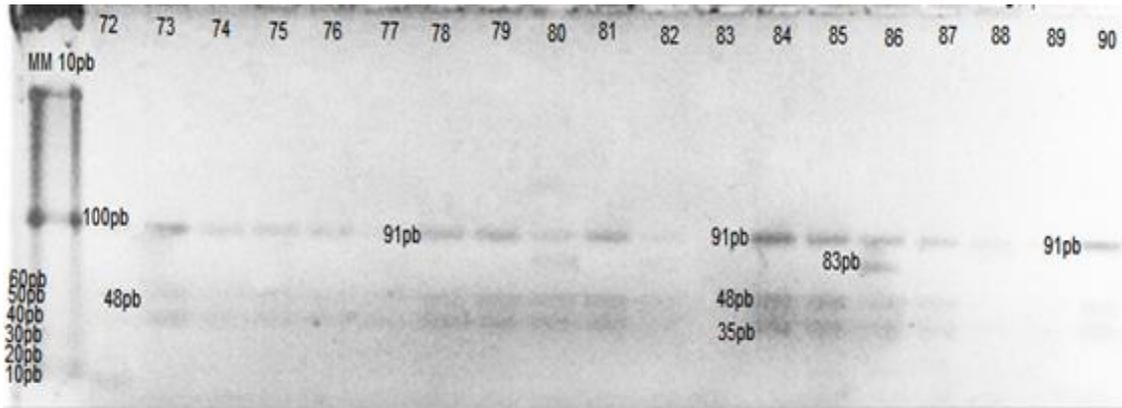


Figura 21. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*

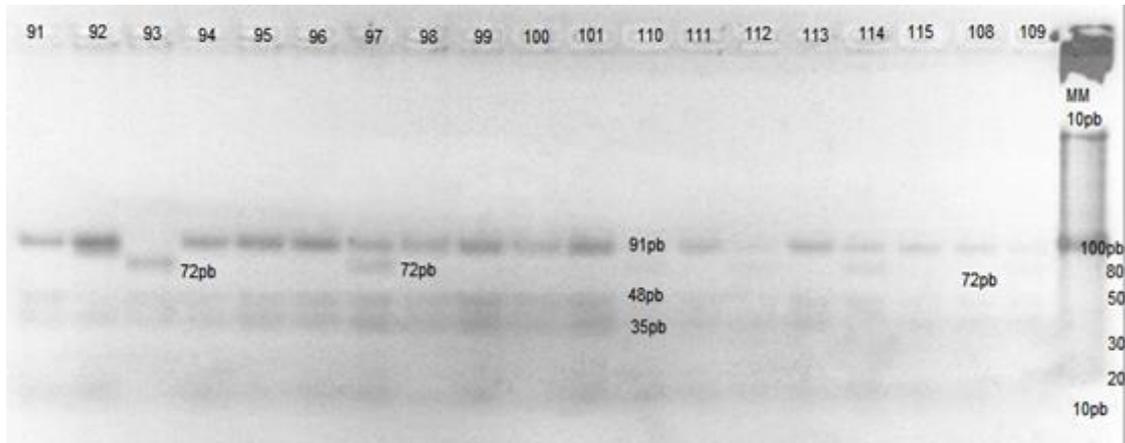


Figura 22. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*

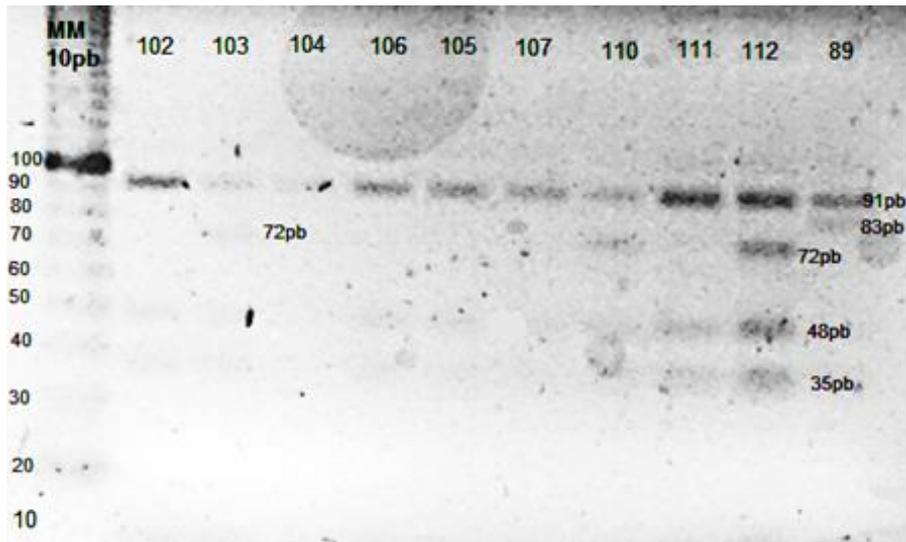


Figura 23. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*

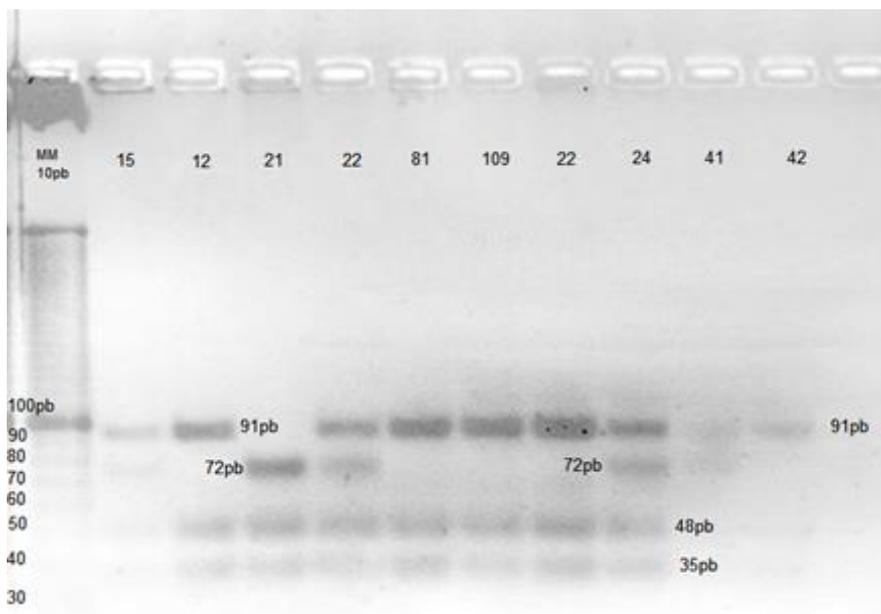


Figura 24. Imagen del gel de agarosa con los con los productos de RFLPs derivados de *apoE*

