



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA CELULAR**

**DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN HAPTOGLOBINA
Y SU CORRELACIÓN CON LOS GENOTIPOS DE LOS
POLIMORFISMOS *rs429358* Y *rs7412* DEL GEN *APOE* EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE INICIO TARDÍO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central
De Venezuela por el bachiller Miguel Gutiérrez Tamí

Como requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología

Tutoras: Dra. Mercedes Fernández-Mestre

Profa. Roxana Gajardo

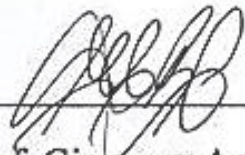
Caracas, Venezuela

Abril 2018

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL Br. MIGUEL ALEXANDER GUTIÉRREZ TAMI**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Miguel Alexander Gutiérrez Tami, C.I: 17.589.617, titulado "DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN HAPTOGLOBINA Y SU CORRELACIÓN CON LOS GENOTIPOS DE LOS POLIMORFISMOS *rs429358* Y *rs7412* DEL GEN APOE EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE INICIO TARDÍO", para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello, se levanta la presente acta en Caracas, a los 09 días del mes de abril del año 2018, dejando constar que la Profa. Roxana Gajardo actuó como coordinadora del jurado examinador.



Prof. Giovanni Angiolillo



Profa. Guillermina Alonso



Dra. Mercedes Fernández-Mestre
(Tutora 1)



Profa. Roxana Gajardo
(Tutora 2- Coordinadora)

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa, causante de una alteración significativa de la estructura y función del cerebro, ocasionando pérdida progresiva de la memoria y de las funciones cognitivas. Es una enfermedad multifactorial sin causa única conocida, y varios factores de riesgo, modificables y no modificables, han sido asociados con su desarrollo y progresión. Se han descrito dos biomarcadores potenciales de EA, el factor derivado de pigmentos epiteliales (PEDF) y la haptoglobina (Hp). La Hp es una α_2 -sialoglicoproteína reactiva de fase aguda, sintetizada principalmente por los hepatocitos en respuesta a la secreción de citoquinas durante procesos inflamatorios. La Hp tiene efecto anti-inflamatorio, por lo que se ha hipotetizado que las concentraciones incrementadas de Hp en pacientes con EA se deben a una respuesta inmunitaria a la reacción inflamatoria del cerebro. Asimismo, se ha descrito una asociación entre las concentraciones de Hp y la severidad de la discapacidad cognitiva, reflejando el incremento de la respuesta anti-inflamatoria contra la neuroinflamación desarrollada en la EA. La interacción entre ApoE y el péptido β amiloide ($A\beta$) es crucial para limitar la neurotoxicidad del péptido $A\beta$ y por promover su limpieza de la zona extracelular, donde se acumula formando las placas seniles. Se ha demostrado que la Hp, más que dificultar la interacción entre ApoE y $A\beta$, promueve la conformación del complejo entre $A\beta$ y ApoE. El riesgo de desarrollar EA podría no estar únicamente relacionado con la presencia de diferentes isoformas de ApoE o limitada a efectos específicos de ApoE en el metabolismo de los lípidos o el péptido $A\beta$, sino también está influenciado por las concentraciones de ligandos críticos, tales como la Hp, capaz de influenciar la interacción ApoE/ $A\beta$ y/o las funciones de ApoE. Por todo lo antes expuesto planteamos el siguiente objetivo: Estudiar el polimorfismo del gen *HP* y su correlación con los polimorfismos *rs429358* y *rs7412* del gen *APOE* en pacientes con EA de inicio tardío. Para alcanzar dicho objetivo se analizó el ADN, obtenido de muestras de sangre periférica, de 55 pacientes con EA (casos) y 77 individuos aparentemente sanos (controles) genotipificados para los polimorfismos *rs429358* y *rs7412* del gen *APOE*. El polimorfismo del gen *HP* se determinó mediante PCR-SSP (iniciadores de secuencias específicas). Las frecuencias se estimaron por conteo directo, las diferencias entre los grupos se evaluó por la prueba de ji cuadrado (X^2) Mantel-Haenszel usando tablas de contingencia 2x2. Al realizar las comparaciones de las frecuencias de los genotipos del gen *HP*, se observó una frecuencia significativamente incrementada del genotipo *HP2-2* (OR: 2.15; IC 95%: 1.05-4.40; pc: 0,031) y

del alelo *HP2* (OR: 1.88; IC 95%: 1.07-3.29; pc: 0,026) en los pacientes con EA. En contraste, en los individuos sanos se observó una frecuencia significativamente incrementada del alelo *HP1* (OR: 0.53; IC 95%: 0.30-0.93; pc: 0,026). Estos resultados sugieren que la presencia del alelo *HP2* y del genotipo homocigoto *HP2-2* confiere mayor riesgo a desarrollar EA, mientras que la presencia del alelo *HP1* confiere protección. En conclusión el polimorfismo del gen *HP* está asociado con el desarrollo de de la EA de inicio tardío en la población venezolana, sin embargo, esta asociación no es independiente de la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*.

Palabras clave: Alzheimer, Haptoglobina, Apolipoproteína, neurotoxicidad.

ABREVIACIONES

°C: Grados centígrados.

α^{1S} : Cadena α^1 de Hp con un residuo aminoácido: ácido glutámico, en la posición 54.

α^{1F} : Cadena α^1 de Hp con un residuo aminoácido: lisina, en la posición 54.

ϵ : Épsilon.

$\epsilon 2$: Alelo Apolipoproteína épsilon 2.

$\epsilon 3$: Alelo Apolipoproteína épsilon 3.

$\epsilon 4$: Alelo Apolipoproteína épsilon 4.

$\mu\text{g/mL}$: Microgramos/mililitros.

μL : Microlitro.

$A\beta$: Péptido beta amiloide.

$A\beta 40$: Péptido beta amiloide de 40 aminoácidos.

$A\beta 42$: Péptido beta amiloide de 42 aminoácidos.

ABO: Gen de grupo sanguíneo ABO.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADAM-9: α -secretasas, desintegrina y metaloproteasa del dominio de proteínas.

ADAM-10: α -secretasas, desintegrina y metaloproteasa del dominio de proteínas.

ADAS: Alzheimer's Disease Assesment Scale, por sus siglas en Inglés.

ADRDA: The Alzheimer's Disease and Related Disorders Association, por sus siglas e Inglés.

AICD: Dominio intracelular de APP.

APOE: Gen de apolipoproteína E.

ApoE: Apolipoproteína E.

ApoE2: Isoforma protéica de apolipoproteína E producto del alelo $\epsilon 2$.

ApoE3: Isoforma protéica de apolipoproteína E producto del alelo $\epsilon 3$.

ApoE4: Isoforma protéica de apolipoproteína E producto del alelo $\epsilon 4$.

APP: Gen de la proteína precursora del amiloide

APP: Proteína precursora del amiloide.

APPs β : Ectodominio de APP secretado en la vía amiloidogénica.

APPs α : Ectodominio de APP secretado en la vía no amiloidogénica.

Arg: Residuo aminoácido arginina.

ARN: Ácido ribonucleico.

Asp: Residuo aminoácido ácido aspártico.

BBB: Barrera hemato-encefálica.

B12: Vitamina B12.

BACE1: Beta-secretasa 1.

C83: Fragmento carboxilo terminal unido a membrana en la vía no amiloidogénica.

C99: Fragmento carboxilo terminal unido a membrana en la vía amiloidogénica.

CAA: Angiopatía amiloide cerebral.

CDR: Test de Demencia Clínica.

CN: Control negativo.

CP: Control positivo.

CSF: Fluido cerebro-espinal.

CTF: Fragmento carboxilo terminal.

Cys: Residuo aminoácido cisteína.

DMS: Manual de diagnóstico y estadístico de desórdenes mentales, por sus siglas en Inglés.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

DO: Densidad óptica.

DSM-IV: Sociedad Psiquiátrica Americana.

E: Valor de frecuencias esperadas.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EDTA-Na₂: Ácido etilendiaminotetraacético y Sodio molecular.

EHW: Equilibrio de Hardy-Weinberg.

EO: Estrés oxidativo.

ERN: Especies reactivas de nitrógeno.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

FA: Frecuencia Alélica.

FG: Frecuencia Genotípica.

g: Gravedad.

g/L: Gramos/Litro.

GDR: Escala de Deterioro Global de Resiberg.

Glu: Residuo aminoácido ácido glutámico.

GWAS: Estudios de asociación del genoma completo.

Hb: Hemoglobina.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

HP: Gen codificante de la Haptoglobina.

Hp: Haptoglobina.

Hp α^{1F} : Cadena α^1 de Hp de migración electroforética rápida (Fast).

Hp α^{1S} : Cadena α^1 de Hp de migración electroforética lenta (Slow).

Hp1-1: Haptoglobina producto de alelos *HP1*, homócigos.

Hp2-1: Haptoglobina producto de alelos *HP1* y *HP2*, heterócigos.

Hp2-2: Haptoglobina producto de alelos *HP2*, homócigos.

HP1: Denota de forma general los alelos para las cadenas alfa 1 de Hp.

HP1-1: Genotipo homócigo para cadena alfa 1 de Hp.

HP2: Denota el alelo de cadena alfa 2 de Hp.

HP2-1: Genotipo heterócigo para cadenas alfa de Hp.

HP2-2: Genotipo homócigo para cadena alfa 2 de Hp.

HPA: Locus genético para cadena alfa de Hp.

HPA1S: Alelo de cadena alfa 1 lenta (s) de Hp.

HPA1F: Alelo de cadena alfa 1 rápida (f) de Hp.

HPB: Locus genético para cadena beta de Hp.

HSPG: Proteoglicanos heparán sulfato.

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

IDE: Enzima degradante de la insulina.

IL-1: Interleuquina 1.

IL-6: Interleuquina 6.

ISF: Líquido intersticial.

IVIC: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

KCl: Cloruro de potasio.

kDa: Kilodalton.

Leu: Residuo aminoácido leucina.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

LDLR: Receptor de LDL.

LRP1: Receptor, Proteína 1 relacionada con LDLR.

Lys: Residuo aminoácido lisina.

M: Molar.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

min: Minutos.

mL: Microlitro.

mM: Milimolar.

N: Número total de individuos estudiados.

n: Número de individuos.

nm: Nanometro.

NaCl: Cloruro de Sodio.

NINCDS: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke.

NLB: Buffer de lisis nuclear, por sus siglas en inglés.

NFTs: Ovillos neurofibrilares, por sus siglas en inglés.

O: Valor de frecuencias observadas.

OR: Odds Ratio (relación de probabilidades).

p: Significancia, probabilidad.

p: Probabilidad.

P-ST: Proteínas quinasas dirigidas a prolina o motivos prolina-serina/treonina.

P3: Fragmento peptídico no amiloidogénico.

pb: Pares de bases nitrogenadas.

pc: Probabilidad corregida.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PCR-RFLP: PCR - Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción.

PCR-SSP: PCR - Iniciadores de secuencia específica.

PEDF: Factor derivado de pigmentos epiteliales.

PHFs: Filamentos helicoidales pareados.

PM: Peso molecular.

pmol/ μ l: Picomol/microlitro.

PSEN: Presenilina.

PSEN: Gen de la Presenilina.

PSEN1: Presenilina 1.

PSEN1: Gen de la presenilina 1.

PSEN2: Presenilina 2.

PSEN2: Gen de presenilina 2.

RCLB: Buffer de lisis de células rojas, por sus siglas en inglés.

RM: Resonancia magnética.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SSP: Iniciador de secuencia específica.

TAC: Tomografía axial computarizada.

TACE: Enzima convertidora de TNF- α .

TBE: Buffer Tris-Ácido bórico-EDTA.

TE: Buffer Tris-EDTA.

Th1: Células T cooperadoras tipo 1.

Th2: Células T cooperadoras tipo 2.

TM: Tamaño molecular.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

Tris HCl: Tris-Ácido clorhídrico.

VDRL: Serología para sífilis.

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

χ^2 : Prueba de Ji-cuadrado.

X²: Prueba Ji cuadrado Mantel-Haenszel.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de la APP por las enzimas secretasas.....	5
Figura 2. Diferencias estructurales entre los tipos de Hp.....	11
Figura 3. Representación esquemática de los alelos <i>HP</i>	12
Figura 4. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X.....	29
Figura 5. Visualización de los productos amplificados para el alelo <i>HP1</i> en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio	30
Figura 6. Visualización de los productos amplificados para el alelo <i>HP2</i> en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.....	31
Figura 7. Principales vías de eliminación de A β y efectos de las isoformas de ApoE.....	42
Figura 8. Modelo del papel de la haptoglobina (Hp) en la respuesta inflamatoria.....	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades funcionales de la haptoglobina.....	14
Tabla 2. Iniciadores utilizados para determinar los alelos <i>HP1</i> y <i>HP2</i> del gen haptoglobina y el gen ABO (control interno).....	24
Tabla 3. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos.....	32
Tabla 4. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen APOE en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos.....	33
Tabla 5: Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del gen <i>HP</i> en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos.....	35
Tabla 6: Frecuencia de las combinaciones genotípicas <i>HP/APOE</i> en pacientes con EA e individuos sanos.....	36
Tabla 7: Comparaciones de frecuencias del genotipo <i>HP2-2/ε 4-</i> y <i>HP2-2/ε 4+</i> entre pacientes y controles.....	46

INDICE

RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
ABREVIACIONES	III
INDICE DE FIGURAS.....	XI
INDICE DE TABLAS	XIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	16
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	49

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia y de neurodegeneración, con casi 44 millones de afectados a nivel mundial (www.alzheimers.net). Los pronósticos estiman que, con el aumento de la esperanza de vida, habrá 107 millones de afectados en el año 2050, lo cual conllevará a importantes cargas económicas y emocionales para las familias, así como a cargas sociales para el mundo industrializado. Es por ello que todos los estudios, enfocados al descubrimiento de sus causas y la comprensión de su patología, son de gran importancia, además, de que pueden llevar a la identificación de nuevas dianas terapéuticas. (Fernández y Cruchaga, 2016).

La EA se caracteriza por ser una patología neurodegenerativa devastadora, que involucra pérdida progresiva de la memoria y de las funciones cognitivas (Spagnuolo y col., 2014a). El paciente con enfermedad de Alzheimer experimenta un incremento gradual de pérdida de la memoria, períodos de pérdida de atención y alteraciones en el humor, con frecuencia acompañados de frustración y agitación. A medida que la enfermedad progresa el paciente llega a un punto en que no puede cuidar de sí mismo y queda postrado en cama, totalmente dependiente de cuidados (Strittmatter y Roses, 1995).

Asimismo, la EA es una enfermedad multifactorial, sin causa única conocida, y varios factores de riesgo, modificables y no modificables, han sido asociados con su desarrollo y progresión. La edad representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EA y la probabilidad de desarrollarla aumenta exponencialmente con la edad, duplicándose, aproximadamente, cada cinco años después de los 65 años de edad. La gran mayoría de los individuos con EA son mayores de 65 años y desarrollan una EA "tardía" o "esporádica" (> 95% de todos los casos). Sin embargo, un número menor de individuos desarrollan la EA antes de los 65 años, que se conoce como EA de "inicio temprano" o "familiar" (<5% de todos los casos), la cual se encuentra asociada a mutaciones genéticas raras. Las personas con EA familiar poseen una mutación autosómica dominante en uno de los genes de presenilina (*PSEN*), localizados en los cromosomas 1 y 14, o en el gen de la proteína precursora del amiloide (*APP*), localizado en el cromosoma 21. Además, individuos con síndrome de Down (trisomía 21) poseen un riesgo incrementado de desarrollar EA de inicio temprano. Sin embargo, la genética de la EA

esporádica es más compleja y menos entendida. Se sabe que el alelo épsilon cuatro ($\epsilon 4$) del gen de la apolipoproteína E (*APOE*), localizado en el cromosoma 19, es un factor de riesgo para el desarrollo de la EA esporádica. Es importante resaltar, que un menor nivel educativo se ha asociado con un mayor riesgo de demencia por EA, consistente con la idea de que la educación aumenta la reserva cognitiva y la resiliencia a la patología de la EA. Muchas evidencias sugieren que los factores de riesgo cerebrovascular desempeñan un papel importante, tanto en el desarrollo como en la progresión de la EA. Personas con antecedentes de diabetes, hipertensión, obesidad y tabaquismo tienen un riesgo incrementado a desarrollar EA. Además, antecedentes familiares de EA en parientes de primer grado y antecedentes de lesión en la cabeza, con pérdida de conciencia, son también factores de riesgo para el desarrollo de la EA (Korolev, 2014).

Neuropatología de la Enfermedad de Alzheimer.

La EA es un trastorno cerebral neurodegenerativo progresivo que causa una alteración significativa de la estructura y función del cerebro. A nivel celular, la EA se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas corticales, especialmente las células piramidales, que median los niveles cognitivos más altos. Distintas evidencias sugieren que la EA produce disfunción sináptica temprana en la enfermedad, interrumpiendo la comunicación dentro de los circuitos neuronales, importantes para la memoria y otras funciones cognitivas. La degeneración relacionada con la EA comienza en el lóbulo temporal medio, específicamente en la corteza entorrinal y el hipocampo. El daño a estas estructuras cerebrales resulta en déficits de memoria y de aprendizaje, que se observan clásicamente con las manifestaciones clínicas tempranas de la EA. La degeneración se propaga a lo largo de la corteza de asociación temporal y áreas parietales. Como la enfermedad progresa, se puede observar degeneración en la corteza frontal y, eventualmente, en el resto del neocórtex. Este patrón generalizado de neurodegeneración, que afecta tanto las regiones límbicas como neocorticales, se correlaciona estrechamente con el conjunto de déficits cognitivos y los cambios de comportamiento que presentan los pacientes con EA. Se ha teorizado que el daño neuronal descrito en la EA se relaciona con la deposición de proteínas anormales, tanto dentro como fuera de las neuronas (Korolev, 2014). Estos agregados de proteínas en el cerebro son las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (NFTs), formados por las proteínas β amiloide ($A\beta$) y tau alteradas,

respectivamente. Evidencias histológicas indican que los NFTs formados por la autoagregación de la proteína tau hiperfosforilada y agregada en filamentos helicoidales pareados (PHFs), son patognomónicos de la enfermedad (Morales, Farías y Maccioni, 2010).

Las placas seniles son acumulaciones extracelulares de proteína beta amiloide insoluble. Normalmente, las células liberan péptidos β amiloide solubles después del clivaje de la proteína precursora del amiloide (APP), proteína integral de la membrana celular. La EA involucra un clivaje anormal de la APP que resulta en la precipitación del A β en láminas betas densas y la formación de placas seniles. Se postula que la microglía y los astrocitos ensamblan una respuesta inflamatoria para limpiar los agregados amiloides y esta inflamación, probablemente, causa la destrucción de neuronas adyacentes y sus neuritas (axones y dendritas) (Dorey, 2014).

Los ovillos neurofibrilares son agregados intracelulares de proteínas tau anormalmente hiperfosforiladas, las cuales en condiciones normales forman parte de una familia de proteínas asociadas a microtúbulos y desempeñan un papel en el transporte intracelular (axonal y vesicular). Es posible que los NFTs interfieran con el transporte axonal normal de los componentes necesarios para la función y supervivencia neuronal (por ejemplo, vesículas sinápticas con neurotransmisores, factores neurotróficos y mitocondrias), causando eventualmente la muerte de las neuronas. (Korolev, 2014)

Diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer.

El diagnóstico de la EA se centra primordialmente en pruebas neurológicas y fisiológicas, además, de examinar señales de disminución intelectual a través de pruebas estándares para determinar las funciones mentales, las cuales son llevadas a cabo con los criterios propuestos por la “*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke*” (NINCDS) y “*The Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association*” (ADRDA) (McKhann y col., 2011) o bien por los criterios dados en el *Manual Diagnóstico y Estadístico de Desórdenes Mentales* (DMS por sus siglas en inglés) (Cummings, 2005). Estos criterios solo son capaces de determinar la posibilidad o probabilidad de que el paciente examinado tenga enfermedad de Alzheimer (Strittmatter y Roses, 1995). El patrón de oro para el diagnóstico de EA es la evaluación patológica de una autopsia cerebral (post-mortem). La presencia y distribución de las

placas amiloides y NFTs en el cerebro se utiliza para establecer el diagnóstico definitivo de EA y el estadio de la enfermedad. (Korolev, 2014).

Génesis del péptido beta amiloide (A β).

El péptido beta amiloide es un péptido de longitud variable, de 34-49 aminoácidos, derivado del clivaje proteolítico de una proteína transmembrana, denominada proteína precursora de amiloide, durante su metabolismo (Strittmatter y Roses, 1995). El A β se genera después del clivaje secuencial de la APP por las β y γ secretasas en la vía amiloidogénica. La génesis del A β puede ser suprimida si la APP es escindida por la α -secretasa dentro del dominio A β , en la llamada vía no amiloidogénica (Figura 1). Recientemente, se han identificado las secretasas y se sabe que la β -secretasa es una enzima de escisión de la APP beta 1 (BACE1), una nueva aspartil proteasa. La γ -secretasa es un complejo proteico, que incluye la presenilina (PSEN1 o PSEN2), nicastrina, Aph1 y Pen2, mientras que tres α -secretasas han sido identificadas como TACE (enzima convertidora de TNF- α), ADAM (una desintegrina y metaloproteasa del dominio de proteínas)-9 y ADAM-10. El clivaje por BACE1 de la APP es un requisito previo para la formación del A β . La génesis del A β se inicia con el clivaje por BACE1 de la APP en el residuo Asp +1 de la secuencia del A β , para formar el extremo amino del péptido. Este clivaje libera dos fragmentos: un ectodominio de APP secretado (APPs β) y un fragmento carboxilo terminal unido a membrana (CTF), C99. C99 es subsiguientemente clivado por la γ -secretasa para generar el extremo carboxilo terminal del péptido A β y un dominio intracelular de APP (AICD). En particular, se ha demostrado que el AICD puede desempeñar un papel en la transactivación transcripcional. La escisión por el complejo γ -secretasa no es precisa, ya que la mayoría de los A β liberados por la actividad γ -secretasa terminan en el aminoácido 40 (A β 40) y una pequeña proporción termina en el aminoácido 42 (A β 42). En la vía alternativa, la vía no amiloidogénica, el clivaje por la α -secretasa de la APP se produce dentro del dominio A β en el residuo Leu +17. El clivaje por la α -secretasa produce el ectodominio APPs α secretado y un CTF (C83), el cual a su vez es clivado por la γ -secretasa para formar el fragmento no amiloidogénico de 3 kDa, P3. En muchos casos, un aumento en el metabolismo no amiloidogénico de la APP se acopla a una disminución recíproca en la vía de procesamiento amiloidogénico, y viceversa, ya que la α y β secretasas compiten por el mismo sustrato, la APP (Cole y Vassar, 2007).

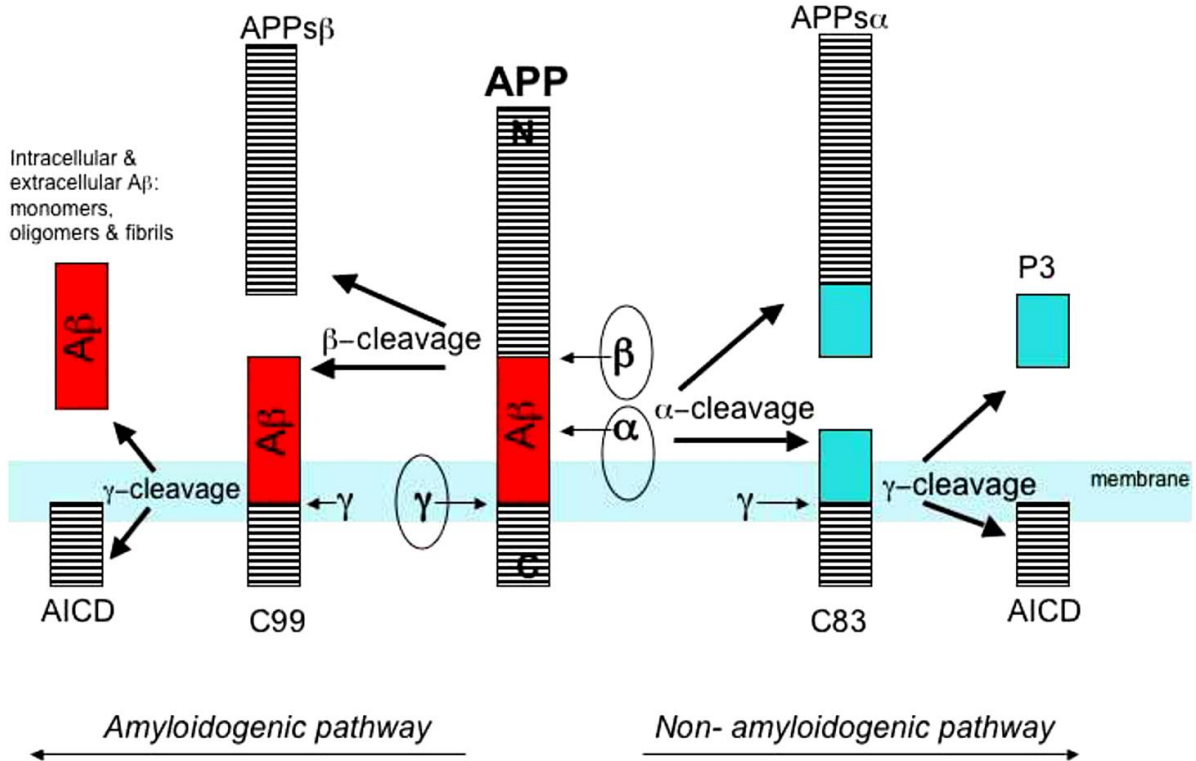


Figura 1. Metabolismo de la APP por las enzimas secretasas. La APP es secuencialmente clivada por la β-secretasa (BACE1) y la γ-secretasa, la cual es un complejo que comprende presenilina, nicastrina, Aph1 y Pen2, para generar el Aβ. El clivaje de la APP por BACE1 es un pre-requisito para la formación del Aβ y es el paso limitante de la tasa de génesis del Aβ. El clivaje de la APP por BACE1 forma el extremo amino terminal del péptido beta amiloide y son generados dos fragmentos: el APPsβ, un ectodominio secretado, y C99, un fragmento unido a membrana. C99 es el sustrato para la γ-secretasa y su clivaje genera el fragmento AICD y el extremo carboxilo terminal del Aβ. La formación del Aβ es evitado por las actividades de la α-secretasa, las cuales han sido identificadas como TACE, ADAM-9 y ADAM-10. Las α-secretasas clivan la APP para generar el ectodominio secretado (APPsα) y un fragmento unido a membrana (C83). C83 es secuencialmente clivado por el complejo γ-secretasa para producir el fragmento de 3 Kda (P3) y el AICD (Tomado de Cole y Vassar, 2007).

Fosforilación de tau.

En el cerebro normal el equilibrio entre fosforilación y defosforilación de tau origina cambios estructurales y conformacionales, regulando la estabilidad del citoesqueleto y consecuentemente la morfología axonal. Estudios previos han demostrado que el proceso de fosforilación/defosforilación puede controlar no sólo la funcionalidad biológica de tau sino también de otras proteínas que forman parte del citoesqueleto en plaquetas y endotelio. Durante el desarrollo de la EA, tau comienza a fosforilarse en múltiples sitios y se integra dentro de los filamentos helicoidales apareados para dar lugar a los NFTs, perdiendo sus funciones fisiológicas. La hiperfosforilación de tau es el resultado del desequilibrio de acción de diferentes quinasas y fosfatasas. Las quinasas involucradas en las modificaciones de tau y degeneración neuronal han sido divididas en dos grupos: proteínas quinasas dirigidas a prolina o motivos prolina-serina/treonina (P-ST) y quinasas que fosforilan motivos distintos a P-ST. La fosforilación anormal de tau evita la unión de fosfotau a microtúbulos (García y Jay, 2004).

Apolipoproteína E como un factor de riesgo de la Enfermedad de Alzheimer.

La Apolipoproteína E (ApoE) es una de las principales apolipoproteína humana, la cual regula la absorción de lípidos y las concentraciones de colesterol a través de la interacción con el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL). La ApoE es altamente expresada en el cerebro e hígado y es la principal proteína en el sistema nervioso central (SNC), mediando el transporte y distribución de lípidos. Periféricamente, la ApoE se combina con otras apolipoproteínas, fosfolípidos y colesterol en partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). En el SNC donde VLDL no está presente, la ApoE forma partículas lipídicas igual a lipoproteínas de alta densidad. Las lipoproteínas que contienen ApoE se unen a una clase de receptores metabólicos conocidos como receptores de LDL (LDLR), principalmente el propio LDLR y la proteína 1 relacionada con LDLR (LRP1). Los LDLR comprenden una familia altamente conservada de receptores transmembrana responsables de la captación y eliminación de las lipoproteínas en plasma y líquido cefalorraquídeo, regulando el metabolismo lipídico y mediando una amplia gama de vías de señalización celular. Las partículas de lipoproteínas, que contienen ApoE y son secretadas por los astrocitos, contienen cantidades aproximadamente iguales de ApoE y colesterol y componen virtualmente todo el colesterol secretado por

astrocitos. Las partículas ApoE con un pobre contenido de lípidos tienen una conformación alterada, disminuyendo la estabilidad en el SNC y alterando las interacciones con el A β . En virtud de ello, en las interacciones con sus receptores, la ApoE debe poseer el contenido apropiado de lípidos (Dorey y col. 2014).

En humanos la apolipoproteína E posee tres isoformas comunes: ApoE2, ApoE3 y ApoE4, que resultan de los polimorfismos en dos nucleótidos del gen *APOE*. ApoE3 se caracteriza por presentar los residuos Cys112 y Arg158, mientras que ApoE2 tiene Cys112 y Cys158, y ApoE4 tiene Arg112 y Arg158. Sin embargo, las diferencias estructurales en esas isoformas no son completamente entendidas. Se ha sugerido que la ApoE modula el procesamiento de la APP, mediando las concentraciones del A β , aunque las evidencias en la literatura son contradictorias. Algunas investigaciones han demostrado que la ApoE no afecta la producción de A β , mientras que otras han demostrado que la ApoE exógena estimula la producción del A β en modelos *in vitro*. Estudios comparativos de las isoformas han demostrado diferencias isoformas específicas, asociándose ApoE4 con altas concentraciones del A β , esto debido a que la eliminación del A β por ApoE4 es menos eficaz. Igualmente, se ha sugerido que los receptores de ApoE, más que la propia ApoE, pueden ser responsables de la modulación del procesamiento de la APP. El papel de la ApoE en la mediación de la agregación de A β puede relacionarse directamente con su capacidad para unirse al péptido, una característica que ha sido bien documentada. ApoE está asociado con placas amiloides y forma complejos con el A β a través de su región unidora de lípido. Esta interacción depende de la disposición del A β en una conformación de lámina β , la cual promueve la formación y la agregación de las fibras de A β . A diferencia de otras isoformas de ApoE, la ApoE4 tiene una capacidad disminuida para unir A β en placas y oligómeros neurotóxicos. Por otro lado, la unión del A β también inhibe la capacidad de la ApoE de unir lípidos, posiblemente debido al solapamiento entre el sitio de unión del A β y el dominio de unión de lípido, lo que puede contribuir a la disfunción general de la ApoE. Por otra parte, modelos de ratones transgénicos y estudios *in vitro* sugieren que la interrupción de la interacción ApoE-A β conduce a una disminución en la fibrillogénesis y la carga amiloide (Dorey y col. 2014).

La ApoE también participa en la eliminación del A β a través de la barrera hematoencefálica (BBB), un proceso mediado por astrocitos y microglía mediante la interacción de

complejos A β -ApoE con receptores de ApoE, particularmente LRP1. Otra evidencia sugiere que la ApoE promueve la retención del A β dentro del SNC, obstaculizando la eliminación del péptido a través de la barrera hemato-encefálica. El cambio entre promover la eliminación versus la retención del A β está mediado por el contenido de lípidos de la ApoE (la unión de lípidos disminuye el transporte a través de la barrera hemato-encefálica), y se ve afectada por las isoformas ApoE específicas. Un estudio sugiere que los complejos ApoE4-A β utilizan el receptor VLDL, una vía más lenta de eliminación, mientras que los complejos ApoE3-A β y ApoE2-A β utilizan LRP1. Finalmente, en un trabajo adicional en ratones transgénicos, se confirmó que la ApoE4 es menos eficiente en la limpieza del A β del cerebro con respecto a las otras isoformas, aunque el mecanismo no está claro. Asimismo, la limpieza del A β del SNC ocurre extracelularmente, a través de la degradación del péptido por la enzima degradante de la insulina (IDE), e intracelularmente, por neprilisina dentro de la microglia y astrocitos. La ApoE se ha implicado en la modulación de esta respuesta, tanto en la degradación microglial del A β y la proteólisis mediada por los macrófagos. Asimismo, un efecto isoforma específica se ha demostrado en células de ratón que expresan las isoformas ApoE humanas, ApoE2 mostrando una degradación extracelular más potente del A β exógeno con respecto a ApoE3 y ApoE4 (Dorey y col. 2014).

La importancia de la ApoE en el proceso de degradación del A β no está claro, ya que hay evidencia de una vía de degradación independiente de ApoE, donde los LDLR interactúan directamente con los péptidos A β . Otra diferencia funcional importante es la disminución de la estabilidad y el aumento de la proteólisis de la ApoE4 en relación con otras isoformas ApoE. Esta diferencia se cree contribuye con las concentraciones más bajas de proteína ApoE en el SNC de ratones transgénicos para ApoE4. Dado el papel de ApoE en la limpieza y degradación del A β , la menor estabilidad de la ApoE4 puede predisponer al desarrollo de EA (Dorey y col. 2014).

Genética de la Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer se diagnostica mayoritariamente en personas entre 75 y 80 años. No obstante, su espectro de aparición es muy amplio dándose casos en edades muy tempranas (por debajo de los 65 años). Estos casos tan precoces suelen presentar un gran

componente genético, con varios afectados en la familia a edades similares, y donde la enfermedad se transmite con un patrón de segregación dominante. Estudios genéticos de desequilibrio de ligamiento en este tipo de familias han revelado que los afectados de Alzheimer son portadores de variantes genéticas en uno de estos tres genes, *APP*, *PSENI* (presenilina 1) o *PSEN2* (presenilina 2), que interfieren en el procesamiento normal de la proteína precursora del amiloide y causan la patología observada. La identificación de tres genes asociados con la enfermedad fue un primer indicativo de que la EA es una enfermedad compleja y multigénica. No obstante, estos casos familiares tan solo representan el 1% de los afectados por la enfermedad, y la mayoría de afectados por Alzheimer no suelen presentar variaciones en estos genes (Fernández y Cruchaga, 2016).

En la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío el único gen que se ha asociado de forma constante con la enfermedad es el gen *APOE*. El gen *APOE* es un gen polimórfico y se han descrito tres alelos: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, siendo el alelo $\epsilon 3$ el más frecuente. El alelo $\epsilon 2$ es el menos frecuente y se ha asociado con algún grado de neuroprotección de la EA y una forma de hiperlipoproteinemia. El alelo $\epsilon 4$ es un fuerte factor de riesgo de EA, comparado a individuos con genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$. Un individuo con el genotipo heterocigoto $\epsilon 3/\epsilon 4$ tiene de 2 a 3 veces mayor riesgo de desarrollar EA y un individuo con el genotipo homocigoto $\epsilon 4/\epsilon 4$ tiene hasta ~12- veces mayor riesgo (Dorey y col. 2014).

No obstante, los estudios indican que el componente hereditario del Alzheimer llega al 60-80%, por lo que varios factores de riesgo quedan por ser descubiertos. Bajo la hipótesis de que una enfermedad común debe estar condicionada al efecto de variantes comunes (aquellas con una frecuencia alélica del alelo mutado por encima del 5%), estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado hasta 20 loci que incrementan el riesgo de una persona de padecer EA. Estos estudios fueron importantes porque sugirieron nuevas rutas metabólicas que pueden estar alteradas en la EA, como por ejemplo, el metabolismo de lípidos, respuesta inflamatoria y endocitosis (Fernández y Cruchaga, 2016).

Haptoglobina (Hp).

La haptoglobina es una α_2 -sialoglicoproteína reactiva de fase aguda sintetizada principalmente por los hepatocitos en respuesta a la secreción de citoquinas, como IL-6, IL-1 y

factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), durante procesos inflamatorios (Wobeto, Zaccariotto y Sonati, 2008), con la principal función de remover la hemoglobina libre procedente de procesos fisiológicos o patológicos. Sus concentraciones plasmáticas se incrementan entre 200-500% durante los 7 días siguientes a eventos inflamatorios e infecciosos y retorna lentamente a la normalidad luego de 2-4 semanas después de haberse removido el agente patológico (Carter y Worwood, 2007).

La Hp está caracterizada por una heterogeneidad molecular con tres principales fenotipos: Hp1-1, Hp2-1 y Hp2-2 (Bowman, 1993). Esta proteína es sintetizada como una única cadena que luego es escindida, produciendo una cadena liviana α amino-terminal y una cadena pesada β carboxilo-terminal, las cuales se unen covalentemente por un puente disulfuro intermolecular, formado entre la Cys 131 y la Cys 248.

La molécula de Hp está constituida por 2 cadenas polipeptídicas:

Cadena liviana α : Se han descrito dos tipos de cadena α : α^1 (8,9 kDa, 83 aminoácidos) y α^2 (16 kDa, 142 aminoácidos). La cadena α^1 presenta dos variantes: α^{1S} y α^{1F} , las cuales difieren en un aminoácido en la posición 54 (ácido glutámico en α^{1S} y lisina en α^{1F}), que produce diferencias en su migración electroforética, siendo la Hp α^{1F} (faster) quien migra más rápido que la Hp α^{1S} (slow).

Cadena pesada β : La cadena β (40 kDa, 245 aminoácidos) es idéntica en todos los tipos de Hp. Como es una glicoproteína, la Hp contiene oligosacáridos en la región amino-terminal de las cadenas β . La capacidad de unirse a la hemoglobina (Hb) es atribuida a esta cadena y una característica interesante de esta cadena es que su extremo amino terminal es altamente homólogo a las serinas proteasas.

La Hp1-1 consiste en un dímero $\alpha^1\beta$, siendo la Hp más pequeña con un peso molecular (PM) de 86 kDa, estas cadenas se unen entre sí covalentemente por puentes disulfuros entre los residuos Cys15 de cada cadena α , conformando estructuras diméricas (Polticelli y col., 2008). La Hp2-2 tiene múltiples unidades $\alpha^2\beta$ (PM: 170-900 kDa) y la Hp2-1 puede estar constituida desde dímeros $\alpha^1\beta$ hasta múltiples unidades $\alpha^2\beta$ (PM: 86-300 kDa), esta última variante tiene la capacidad de formar multímeros con un mínimo de 3 subunidades involucradas en la unión

covalente de enlaces disulfuro entre la Cys15 de cada forma monomérica y la Cys74 del monómero más cercano (Figura 2) (Langlois y Delanghe, 1996).

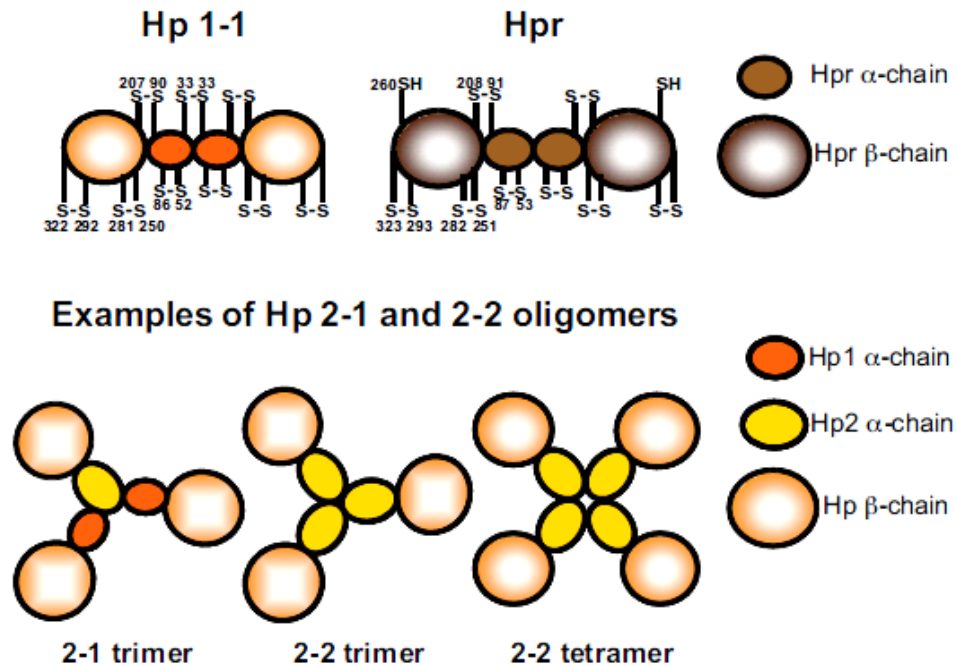


Figura 2. Diferencias estructurales entre los tipos de Hp. (Tomado de: Nielsen y Moestrup, 2009).

La cadena α y β en la molécula de Hp son codificadas por 2 locus genéticos: *HPA* y *HPB*. Siendo el locus para la cadena β no polimórfico. El locus de la cadena α está ubicado en el brazo largo del cromosoma 16 (16q22) y las cadenas α son codificadas por 3 alelos *HPA1S*, *HPA1F* y *HPA2* (Sadzadeh y Bozorgmehr, 2004). Los locus correspondientes a las cadenas α y β están relacionados, de modo que una molécula de ARN mensajero produce una cadena polipeptídica larga que luego es escindida, generando las dos subunidades de la cadena de Hp.

La variante *HP1* tiene 5 exones que codifica una proteína de 347 aminoácidos con un peso molecular de 39 kDa. Los primeros 4 exones codifican la subunidad α (α_1) y el quinto exón codifica la subunidad β . Los productos genéticos de *HPA1S* y *HPA1F* difieren por la sustitución de solo un aminoácido, codificado por el codón 53 del exón 4. La cadena α^{1F} presenta una lisina

(Lys), mientras que en α^{1S} un residuo de ácido glutámico (Glu), debido a una mutación puntual en el alelo *HP1* heterocigoto (Tomado de: Langlois y Delanghe 1996).

La variante *HP2* posee 7 exones que codifican para una proteína de 406 aminoácidos con un peso molecular de 45 kDa, los primeros 6 exones codifican una subunidad α larga (α_2), constituida por 83 aminoácidos, y el exón 7 codifica la subunidad β (Carter y Worwood, 2007). Como se observa en la Figura 3, la formación del alelo *HP2* es el resultado de los eventos de ruptura y unión en posiciones no homólogas entre los intrones 2 y 4 de dos genes *HP1*. La principal diferencia entre los alelos *HP1* y *HP2* es la presencia de un segmento de ADN duplicado de aproximadamente 1700 pb en *HP2* (Wobeto, Zaccariotto y Sonati, 2008).

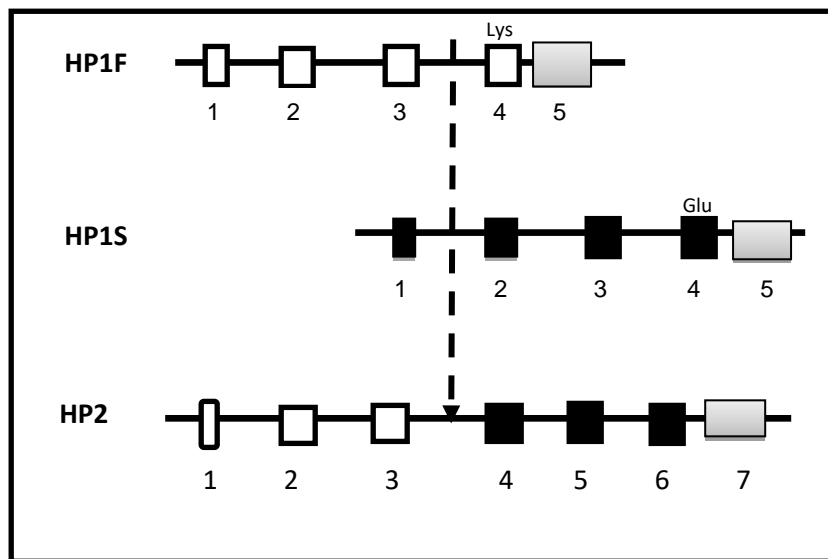


Figura 3. Representación esquemática de los alelos *HP*. Los cuadrados muestran los exones (Tomado de Wobeto, Zaccariotto y Sonati, 2008).

El tejido hepático es el principal sitio de expresión de haptoglobina. No obstante, el gen *HP* también se expresa en pulmones, piel, bazo, riñón y tejido adiposo. La síntesis hepática de Hp es inducida por citoquinas, como IL-6, IL-1 y el TNF- α , la hormona de crecimiento, insulina, endotoxinas bacterianas y prostaglandina (Raynes, Eagling y McAdam, 1991), las cuales son sintetizadas bajo estímulos inflamatorios y/o infecciosos.

La concentración sérica de Hp está influenciada por la edad y sus subtipos. Esta proteína comienza a ser detectable a partir del tercer mes de vida con un aumento gradual hasta la adultez, con un rango entre 0,38-2,08 g/L. Las personas sanas con genotipos *HP1-1* producen mayores concentraciones de la proteína (0,57-2,27 g/L), seguidos por los genotipos heterocigotos *HP2-1* (0,44-1,83 g/L) y los genotipos *HP2-2* (0,38-1,50g/L). La vida media de la Hp es 3,5 días, mientras que la del complejo Hp-Hb es de aproximadamente 10 minutos (Langlois y Delanghe, 1996).

Una vez formado el complejo Hp-Hb es rápidamente removido de la circulación por los hepatocitos y de los tejidos por macrófagos/monocitos. El receptor para el complejo Hp-Hb en los hepatocitos todavía no ha sido caracterizado, pero posee una alta afinidad por el complejo y aparentemente reconoce el cambio conformacional que ocurre en la molécula de Hp cuando se une a Hb. Luego que el complejo es internalizado en las células del parénquima hepático, los organelos que contienen el complejo Hp-Hb lo disocian en subunidades que son posteriormente degradadas (Kino y col., 1980; Zuwala-Jagiello y Osada, 1998).

Los fenotipos de Hp poseen diferencias estructurales y bioquímicas que proveen a cada uno propiedades distintas, tanto en la función como en el grado en que la ejercen. Además, se ha demostrado que la Hp actúa tanto en complejo con la Hb como de manera independiente, en cada modo de actuación ejerce sus funciones con mecanismos y consecuencias diferentes (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades funcionales de la haptoglobina

Fenotipos	Propiedades	Referencia
	Concentraciones plasmáticas	Langlois, M. y Delanghe, J. 1996
Hp 1-1	Alta (0,57-2,27 g/L)	
Hp 2-2	Baja (0,38-1,50g/L)	
	Capacidad antioxidante	Guéye, P. et al. 2006
Hp 1-1	Alta	
Hp 2-2	Baja	
	Afinidad por la hemoglobina	Langlois, M. y Delanghe, J. 1996
Hp 1-1	Alta	
Hp 2-2	Baja	
	Limpieza de Hp-Hb (mediada por CD163)	Asleh, R. et al. 2003
Hp 1-1	Mayor	
Hp 2-2	Menor	
	Propiedades Inmuno-moduladoras	Guetta, J. et al. 2007
Hp 1-1	Induce grandes cantidades de interleuquinas anti-inflamatorias. Propiedades anti-inflamatoria más prominentes	
Hp 2-2	Induce menos cantidades de interleuquinas anti-inflamatorias. Propiedades anti-inflamatorias menos prominentes.	

Influencia de la haptoglobina en el mecanismo por el cual el colesterol es trasladado de los astrocitos a las neuronas.

El colesterol es un componente clave en las membranas biológicas, participando en la modulación de su fluidez, y es el precursor de varias moléculas de señalización, incluyendo hormonas esteroideas. Aproximadamente, 25% del colesterol total del cuerpo reside en el cerebro, principalmente en la vaina de mielina que rodea los axones, donde facilita la transmisión de señales eléctricas y juega un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de la plasticidad y función neuronal. La barrera hemato-encefálica previene la absorción de este lípido de la

circulación, de tal manera que la mayoría del colesterol presente en el cerebro es sintetizado *in situ*. Como la síntesis intracelular es regulada negativamente en el cerebro maduro, las neuronas hallan su requerimiento de colesterol esencialmente a través de la absorción de colesterol llevado por las lipoproteínas que poseen ApoE, secretadas por las células gliales. Este sistema de transporte específico recicla colesterol y depende principalmente de la presencia de ApoE. Los astrocitos liberan colesterol y ApoE que son ensamblados con fosfolípidos en partículas de lipoproteínas, las cuales son similares en tamaño a la HDL plasmática. Estas lipoproteínas interactúan vía ApoE con LDLR y con LRP1, expresado en las neuronas, liberando así colesterol para el crecimiento, reparación y sinaptogénesis. Por esta vía, el colesterol es transportado de los astrocitos a las neuronas (Revisado en Spagnuolo y col., 2014a).

El mantenimiento del balance correcto de colesterol es crítico para la función neuronal y cualquier alteración en las concentraciones de colesterol puede afectar severamente el rendimiento cerebral. El decaimiento del rendimiento es una característica del envejecimiento. Además, la alteración de la distribución y el metabolismo del colesterol en el cerebro se han implicado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, los mecanismos precisos subyacentes de la asociación entre el metabolismo alterado del colesterol y las enfermedades neurodegenerativas no han sido clarificados. Por lo tanto, la ApoE juega un papel clave en la regulación de la homeostasis del colesterol en el cerebro y posiblemente los ligandos que modulan sus funciones puedan tener un papel crítico en la fisiología del cerebro. En este contexto, Spagnuolo y colaboradores describieron que la Hp, una proteína de fase aguda de la inflamación, se une a la ApoE, influyendo así en la estimulación de la esterificación del colesterol por la enzima lecitina, colesterol-acil-transferasa, y la absorción de colesterol por los hepatocitos. La Hp se conoce por su papel en la unión y transporte de la Hb al hígado, pero fue inicialmente identificado como un marcador de la disfunción de la barrera hemato-encefálica. Además, algunos estudios han señalado que esta proteína puede producirse en el cerebro en respuesta a diferentes estímulos de estrés y se ha encontrado concentraciones incrementadas de Hp en el fluido cerebro-espinal (CSF) de pacientes con EA y otras enfermedades neurodegenerativas, como la de Parkinson y Huntington (Spagnuolo y col., 2014a).

ANTECEDENTES

Una preocupación creciente en el mundo científico es la identificación de biomarcadores putativos para diagnosticar el riesgo a desarrollar EA (Spagnuolo y col., 2014b). Para mejorar las herramientas diagnósticas de esta patología, es de gran importancia identificar biomarcadores sensibles y confiables que sean de fácil adquisición o recolección, mediante procedimientos no invasivos y seguros. Los fluidos corporales son una gran fuente de biomarcadores putativos, por ello el CSF, plasma y suero son tomados en consideración para buscar moléculas biológicas que puedan estar relacionadas con EA (Cocciolo y col., 2012). Abraham y colaboradores, en el año 2010, describieron dos biomarcadores potenciales de EA, el factor derivado de pigmentos epiteliales (PEDF) y la haptoglobina, los cuales mostraron perfiles proteómicos específicos en los diferentes tipos de demencia (Abraham y col., 2010).

La haptoglobina es una proteína de fase aguda con actividades antioxidativas y anti-inflamatorias y se ha descrito que se encuentra regulada negativamente o altamente oxidada en pacientes con EA (Song y col., 2015). La respuesta de fase aguda es la primera reacción del hospedador al daño inducido por infección, inflamación o una enfermedad mediada inmunológicamente, generando algunas modificaciones bioquímicas y clínicas, siendo la más fácilmente observable el incremento en la concentración de algunas proteínas en el plasma. Esta reacción es denominada “aguda” y puede ser medida dentro de las primeras horas desde el inicio del daño (Giometto y col., 1988). Las concentraciones de Hp sérica se han encontrado incrementadas en pacientes con sepsis, así como en pacientes con desórdenes neurodegenerativos, como la EA (Song y col., 2015). Además, un número considerable de estudios describen la participación de la inflamación en la patofisiología de la EA (Song y col., 2015). Se ha descrito una asociación positiva entre la concentración de Hp sérica y EA, apoyando la hipótesis de que el estrés oxidativo (EO) y las reacciones neuroinflamatorias juegan un papel importante en la patogénesis de la EA (Song y col., 2015). La Hp tiene efecto anti-inflamatorio, por lo que se ha hipotetizado que las concentraciones incrementadas de Hp en pacientes con EA se deben a una respuesta inmunitaria reguladora de la reacción inflamatoria del cerebro (Song y col., 2015). Por otra parte, se ha descrito una asociación entre las concentraciones de Hp y la severidad de la discapacidad cognitiva, reflejando el incremento de la

respuesta anti-inflamatoria contra la neuroinflamación desarrollada en la EA (Song y col., 2015). Asimismo, se ha descrito que las concentraciones de Hp se encuentran incrementadas en CSF de pacientes con EA y otras enfermedades neurodegenerativas, como enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington (Spagnuolo y col., 2014a).

Una de las funciones de la haptoglobina es la de recolector la Hb en sangre periférica. La afinidad de Hp por Hb disminuye con el número de alelos *HP2*, los individuos *HP2-2* sintetizan menos Hp que los sujetos *HP1-1*. Por lo tanto, los individuos *HP2-2* son más susceptibles a patologías inducidas por estrés oxidativo, tales como hemocromatosis o EA (Jhonson y col., 1992).

Spagnuolo y colaboradores (2014) describieron que la Hp forma un complejo con el A β , determinado por experimentos de inmuno-blot con proteínas purificadas o mediante inmunoprecipitación en tejido de cerebro procedente de pacientes con EA. La interacción entre ApoE y A β es crucial para limitar la neurotoxicidad del A β y promover su limpieza de la zona extracelular, donde se acumula formando las placas seniles. Se ha demostrado que la Hp, más que dificultar el ligamiento entre ApoE y el A β , promueve la conformación del complejo entre el A β y ApoE2, ApoE3 o ApoE4 (Spagnuolo y col., 2014b). Dichos datos sugieren que las funciones de Hp y ApoE en el cerebro deben ser evaluadas tomando en cuenta su interacción con el A β . Estudios recientes apuntan que los oligodendrocitos y astrocitos producen Hp en respuesta a diferentes estímulos por estrés, siendo el efecto de la Hp particularmente más pronunciado en presencia de ApoE4, isoforma involucrada con la patogénesis de EA (Spagnuolo y col., 2014b).

Los resultados del estudio de Spagnuolo y col. (2014) demostraron que los 3 fenotipos de Hp enlazan péptidos A β con eficiencia similar, lo que sugiere que esta interacción podría principalmente depender de las cadenas beta de la Hp, que también están involucradas en el ligamiento con Hb. Esta hipótesis está apoyada por el hallazgo de que el A β compite con la Hb por enlazarse a Hp (Spagnuolo y col., 2014b). Hp es la primera molécula identificada por ser apta para mejorar los enlaces entre ApoE y el A β . Se ha postulado que la Hp puede actuar como un puente entre las dos proteínas, ubicándolas cerca la una a la otra. Alternativamente, la Hp podría influir en la conformación molecular de estos dos ligandos, ApoE y A β , de forma tal que incrementa la probabilidad de interacción entre ellos (Spagnuolo y col., 2014b).

La expresión de cadenas beta de Hp pueden ser considerados marcadores putativos de la enfermedad, ya que pueden ser detectados en una etapa temprana de la EA y persisten durante la progresión de la misma, siendo reconocible como una importante firma (o señal) de la EA en plasma (Cocciolo y col., 2012). Además, varios grupos de investigadores han sugerido que la concentración de Hp sérica podría ser un posible factor de riesgo para el desarrollo de EA (Song y col., 2015).

Considerando que el riesgo a desarrollar EA podría no estar únicamente relacionado con la presencia de diferentes isoformas de ApoE, o estar limitado a efectos específicos de ApoE en el metabolismo de los lípidos o el A β , sino que también podría estar influenciado por las concentraciones de ligandos como la Hp, la cual es capaz de afectar la interacción ApoE:A β y/o las funciones de la ApoE (Spagnuolo y col., 2014b), se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Estudiar el polimorfismo del gen *HP* y su correlación con los polimorfismos *rs429358* y *rs7412* del gen *APOE* en pacientes con Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

Objetivos específicos:

- Determinar la distribución de los genotipos del gen *HP* en individuos venezolanos sanos y con Enfermedad de Alzheimer.
- Establecer posibles asociaciones entre los genotipos del gen *HP* y el riesgo a padecer EA.
- Correlacionar los genotipos del gen *HP* con los genotipos (*rs429358* y *rs7412*) del gen *APOE* y el riesgo a padecer EA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de pacientes con EA.

Este grupo incluyó 55 pacientes (edad promedio de 70 ± 10 años) con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, quienes acudieron al Servicio de Neurología del Hospital Clínico de Caracas, entre Septiembre del 2004 y Octubre del 2006. Dichos pacientes fueron seleccionados según el protocolo clínico aplicado en la Unidad de Neuropsicología Dr. Luis Borges, del Servicio de Neurología del Hospital Clínico de Caracas.

Dicho protocolo se estructuró de acuerdo a los siguientes criterios:

- a) Criterios de la Sociedad Psiquiátrica Americana (DSM-IV), del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos, de la Comunicación y de Accidentes Vasculares Cerebrales (NINCDS) y los criterios de la Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Conexos (ADRDA).
- b) Evaluación médica geriátrica, la cual consistió en la historia clínica general y la aplicación de la escala de Deterioro Global de Resberg (GDR) y del Test de Demencia Clínica (CDR).
- c) Evaluación médica neurológica según protocolo clínico específico, documentada con el minexamen mental de Folstein, la escala isquémica de Hachinski y los instrumentos de evaluación diagnóstica para demencia vascular (ADDTC, MINDA-ADRA).
- d) Evaluación psicológica, realizada mediante entrevistas dirigidas a pacientes y familiares, así como también la aplicación de baterías de pruebas neuropsicológicas y el Alzheimer's Disease Assesment Scale (ADAS).
- e) Estudios imagenológicos correspondientes a la evaluación estructural por neuroimagen mediante las pruebas de tomografía axial computarizada (TAC) y/o resonancia magnética (RM).

f) Estudios de laboratorio: hematología completa química sanguínea, electrolitos, hormonas tiroideas (T3, T4, TSH), VDRL y VIH, niveles de B12.

g) Electroencefalograma de manera opcional.

Selección del grupo control.8

El grupo control quedó conformado por 77 individuos sanos, venezolanos, con un promedio de edad de 71 ± 10 años. A este grupo se le realizó el miniexamen mental de Folstein (Folstein, Folstein y McHugh, 1975), las pruebas de laboratorio e imagenológicas.

Todos los individuos participantes en el estudio firmaron un consentimiento informado, el cual en el caso de los pacientes con EA, fue autorizado por su representante. Dicho consentimiento fue aprobado por el Comité de Bioética del IVIC.

Extracción del ADN genómico.

El ADN genómico fue extraído por el Doctor N. Cedeño, quien utilizó los siguientes métodos: el método con solvente orgánico (Bunce M., 2000) y la utilización del estuche QIAamp DNA Mini de Qiagen.

El ADN se obtuvo a partir de 10 mL de sangre periférica utilizando EDTA- Na_2 como anticoagulante.

1. Extracción de ADN genómico por el Método de Bunce.

La muestra de sangre periférica se centrifugó durante 10 min. a 800 g para obtener los glóbulos blancos (leucocitos y linfocitos), los cuales fueron lavados con 10 mL de buffer de lisis de células rojas (RCLB, red cell lysis buffer). Luego se centrifugó a 800 g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con RCLB hasta que el precipitado de glóbulos blancos quedó de color blanco. El precipitado se resuspendió en 3 mL de buffer de lisis nuclear (NLB, Nuclear Lysis Buffer) y se dejó en baño a 56°C hasta que se disolvió. Luego se añadió 1 mL de cloruro de sodio (NaCl 5,25 M), se agitó por vórtex durante 2 segundos, se añadieron 2 mL de cloroformo, se volvió a agitar hasta que se formó una solución lechosa, se centrifugó durante 20 min. a 1000 g, se tomó la fase acuosa y se transfirió a un tubo de polipropileno. A la fase acuosa extraída se le añadieron 2 volúmenes de etanol 95% frío, se rotó el tubo hasta que

precipitó el ADN, se atrapó el ADN en forma de malla con una pipeta de transferencia de polipropileno y se pasó a un tubo estéril de 1,5 mL. El ADN se resuspendió en etanol 70% y se centrifugó durante 5 min. a máxima velocidad y se volteó el tubo sobre una servilleta para eliminar el exceso de etanol. Finalmente, se resuspendió el ADN en buffer TE 1X hasta su dilución.

2. Extracción de ADN genómico por el estuche Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit) de laboratorios Roche.

La muestra de sangre periférica se centrifugó durante 10 min. a 800 g para obtener los glóbulos blancos (leucocitos y linfocitos) y se transfirió 200 µL de los mismos a un tubo de 1,5 mL con 20 µL de proteasa. Posteriormente, se añadió 200 µL de buffer AL, se mezcló 15 segundos en vórtex, se incubó a 56°C por 10 min. y se centrifugó para bajar las gotas de la tapa. Luego se añadió 200 µL de etanol 96%, se mezcló por vórtex 15 segundos y se centrifugó para bajar las gotas. A continuación, se colocó una columna de QIAamp en un tubo colector de 2 mL y se transfirió la mezcla anterior por la columna de QIAamp sin mojar los bordes, se tapó bien y se centrifugó a 800 g por 1 min. Seguidamente, se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL, se abrió cuidadosamente la columna y se añadió 500 µL de buffer Aw1 sin mojar los bordes, se centrifugó a 800 g por 1 minuto y posteriormente se colocó la columna en un nuevo tubo colector de 2 mL y se descartó el que poseía el filtrado. Se abrió la columna cuidadosamente y se añadió 500 µL de buffer Aw2 sin mojar los bordes, se tapó bien y se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos. Finalmente, se colocó la columna en un tubo de 1,5 mL nuevo y se añadió 200 µL del buffer AE, se incubó a temperatura ambiente por 15 min y se centrifugó a 13000 g por 1 minuto.

Determinación de la concentración y pureza de ADN genómico.

La concentración de ADN se estimó por la lectura de la densidad óptica (DO), midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm de cada muestra (2 µl) utilizando un nanodrop (NanoDrop™ 2000).

La concentración del ADN (µg/mL) se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN de doble cadena}] = 50 \mu\text{g/mL (factor constante)} \times \text{DO } 260\text{nm.}$$

DO: densidad óptica

1 DO 260 nm = 50 µg de ADN/ mL

La pureza del ADN se calculó mediante la relación DO260nm / DO280nm. Esta relación debe ser mayor o igual a 1.7 para garantizar la pureza del ADN aislado.

Calidad del ADN genómico.

La calidad del ADN genómico, extraído de las muestras de sangre, se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,75% en buffer TBE 1X (Tris-Acido Bórico-EDTA), coloreado con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). En cada pozo del gel se colocaron 2µL de buffer de carga con 5µL de ADN. En uno de los pozos del gel se colocó, como control, 5 µl del fago lambda (200 µg/mL) sin digerir. La corrida electroforética se realizó a 100 voltios, por 30 minutos.

Genotipificación del gen *APOE*.

La genotipificación y evaluación del polimorfismo de APOE fue realizada por el personal de la Sección Inmunogenética del Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental-IVIC. La determinación fue realizada mediante la técnica PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa- Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción), utilizando los iniciadores descritos por Emi y colaboradores (1988) y utilizando el protocolo descrito por Hixson & Vernier (1990).

Método para el análisis del polimorfismo del gen *HP*.

Para el análisis del polimorfismo genéticos se utilizó la técnica PCR-SSP (reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específicas), la cual se fundamenta en que solo los iniciadores cuyas secuencias son perfectamente complementarias a la muestra del ADN, hibridan y producen el fragmento correspondiente al gen de interés (Shymala y Ames, 1993). Después del proceso de PCR, los fragmentos de ADN amplificados se separan mediante electroforesis en geles de agarosa, previamente teñidos con bromuro de etidio. La interpretación de los resultados de la PCR-SSP se basa en la presencia o ausencia de un fragmento específico de ADN. Dado que la amplificación durante la reacción de PCR puede ser adversamente afectada por diversos factores (errores de pipeteo, calidad deficiente del ADN, presencia de

inhibidores, etc.), es incluido un par de iniciadores que amplifican un control interno. Este par de iniciadores amplifican una región conservada de un gen constitutivo, que está presente en todas las muestras de ADN humano y se utiliza para verificar la integridad de la reacción de PCR. En presencia de una banda positiva de tipificación (amplificación específica de un alelo), el producto del par de iniciadores del control interno puede estar débil o ausente debido a las diferencias en concentración y a las temperaturas de fusión entre los pares de iniciadores específicos y el par de iniciadores del control interno.

Análisis de los polimorfismos de *HP* por el método de la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencias específicas (PCR-SSP).

Para la determinación del polimorfismo genético de *HP* se utilizó la técnica de PCR-SSP, que permite distinguir directamente las formas alélicas entre las variantes del mismo sistema. Se fundamenta en que solo los iniciadores cuyas secuencias son perfectamente complementarias a los de la muestra de ADN, hibridarán y amplificarán un fragmento específico. Para la amplificación de los alelos de *HP1* y *HP2*, se utilizaron los iniciadores y el protocolo descrito por Koch y cols., 2002 (Tabla 2). En todas las reacciones se incluyó como control interno de la PCR los iniciadores del grupo sanguíneo ABO, descrito por Olsson y colaboradores (1998).

Para cada alelo se prepararon dos mezcla de reacción, una para la determinación del alelo *HP1* y otra para la determinación del alelo *HP2* (Koch y cols., 2002).

Tabla 2. Iniciadores utilizados para determinar los alelos *HP1* y *HP2* del gen de haptoglobina y el gen *ABO* (control interno)

Alelos	Iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicón (pb)
<i>HP1</i>	A B	GAGGGGAGCTTGCCTTTCCATTG GAGATTTTTGAGCCCTGGCTGGT	1757
<i>HP2</i>	C D	CCTGCCTCGTATTAAACTGCACCAT CCGAGTGCTCCACATAGCCATGT	349
<i>ABO</i>	ABO 516s ABO 926s	CTGGAGGTGCGCGCCTAC ACGAATTCTACTTGTTCAGGTGGCTCTCGTC	419

Determinación del alelo HP1:

Para la determinación del alelo *HP1* se preparará la siguiente mezcla de reacción por cada muestra: 6,25 µl de agua destilada, 4 µl de PCR Buffer 5X (1X), 2 µl de los iniciadores A y B del gen *HP* (1 pmol/µl), 0,2 µl de los iniciadores del gen *ABO* (1 pmol/µl), 0,4 µl de Tris HCl (0,4 mM), 1µl de KCl (2,5 mM); 0,4 µl de dNTPs (0,2 mM), 1,3µl de MgCl₂ (3,25 mM); 1.25 U/ml de la enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen) y 2µl de muestra de ADN genómico (200 µg/ml) para completar un volumen final de 20 µl. Se incluyeron dos controles cada vez que se procesaron las muestras, un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) y un control positivo (mezcla de reacción con ADN de un individuo homocigoto *HP1-1*)

Las siguientes condiciones se utilizaron para la amplificación: 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 95°C por 1 minuto, hibridación a 69°C por 2 minutos y extensión a 72°C por 30 segundos, finalizando con una etapa de 72°C por 7 minutos. Koch y colaboradores establecieron como tiempo de hibridación 2

minutos cuando son utilizados los iniciadores A y B o los iniciadores A, B, C, y D simultáneamente (Koch y cols., 2002)

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Sigma) al 1 %, teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó por 40 min. a 100 voltios y se utilizó como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Lucigen). La asignación del alelo *HP1* se determinó por la visualización de una banda de 1757 pb.

Determinación del alelo HP2.

Para la determinación del alelo *HP2* se preparó la siguiente mezcla de reacción por cada muestra: 6,25 µl de agua destilada, 4 µl de PCR Buffer 5X (1X), 2 µl de los iniciadores C y D del gen *HP* (1 pmol/µl), 0,2 µl de los iniciadores del gen *ABO* (0,1 pmol/µl), 0,4 µl de Tris HCl (0,4mM), 1 µl de KCl (2,5 mM); 0,4 µl de dNTPs (0,2mM), 1,3 µl de MgCl₂ (3,25 mM); 1.25 U/ml de la enzima Taq polimerasa Go (Promega), y 2 µl de muestra de ADN genómico (200 µg/ml) para completar un volumen final de 20 µl. Se incluyeron dos controles cada vez que se procesaron las muestras, un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) y un control positivo (mezcla de reacción con ADN de un individuo homocigoto *HP 2-2*).

Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación: 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 95°C por 1 minuto, hibridación a 69°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 30 segundos, finalizando con una etapa a 72°C por 7 minutos. Koch y colaboradores establecieron como tiempo de hibridación 1 minuto cuando son utilizados únicamente los iniciadores C y D (Koch y cols., 2002)

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó por 40 min a 100 voltios y se utilizó como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Lucigen). La asignación del alelo *HP2* se determinó por la visualización de una banda de 349 pb.

Asignación de genotipos.

La asignación de los genotipos de *HP*, en los pacientes y los controles, se realizó considerando la presencia de bandas en los geles de agarosa. El genotipo *HP1-1* se identificó

por la presencia de una única banda de 1757 pb, el genotipo *HP2-1* por la presencia de la banda de 1757 pb (correspondiente al alelo *HP1*) y la banda de 349 pb (correspondiente al alelo *HP2*). Finalmente, el genotipo *HP2-2* por la presencia de una única banda de 349 pb.

Análisis estadístico.

Prueba de equilibrio de distribución genética de Hardy-Weinberg (EHW).

Se realizó la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) para la distribución genotípica en los individuos sanos.

La significancia (p) del desequilibrio de los genotipos se calculó con la prueba de χ^2 de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \sum (\mathbf{O} - \mathbf{E})^2 / \mathbf{E}$$

Donde **O** representa el valor de las frecuencias observadas y **E** el valor de las frecuencias esperadas. La significancia (p) del mismo se buscó en la tabla de χ^2 con 1 grado de libertad. (Court y Michael, 2012).

El estudio comparativo entre los casos y controles se realizó en base al cálculo de:

Frecuencias alélicas y genotípicas. La frecuencia alélica (FA) del gen *HP*, se obtuvo por conteo directo a partir de los fenotipos asignados a cada individuo. Se determinó el número de veces que se observó el alelo y se dividió entre dos veces el número total de individuos estudiados (N).

$$FA = \frac{n^{\circ} \text{ veces que se observa el alelo}}{2N}$$

En cuanto, a las frecuencias genotípicas (FG), se obtuvieron por conteo directo a partir de los fenotipos asignados a cada individuo. Se determinó el número de veces que se observó el genotipo y se dividió entre el número total de individuos estudiados (N).

$$FG = \frac{\text{n}^\circ \text{ veces que se observa el genotipo}}{N}$$

Pruebas de Asociación.

Para evaluar las diferencias de frecuencias de los alelos y genotipos del gen *HP* entre pacientes con EA se realizó la estimación mediante la prueba de Ji-cuadrado (X^2) Mantel-Haenszel usando tablas de contingencia 2x2. Los valores de (p) se corrigieron multiplicándolos por el número de comparaciones hechas (corrección de Bonferroni) (Svejgaard y Ryder, 1994) y se consideraron significativos cuando el valor de probabilidad (p) fue menor de 0,05.

Odds Ratio o relación de probabilidades.

La intensidad de la asociación se calculó como Odds Ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95%.

Un OR < 1 indica protección, mientras un OR >1 indica un riesgo incrementado. El OR se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$OR = \frac{\text{Odds de exposición en casos}}{\text{Odds de exposición en controles}} = \frac{a/b}{c/d} = \frac{ad}{bc}$$

$$\text{Odds de exposición en casos} = \frac{a \times (a + b)}{b \times (a + b)} = a/b$$

$$\text{Odds de exposición en controles} = \frac{c \times (c + d)}{d \times (c + d)} = c/d$$

	Factor de riesgo presente	Factor de riesgo Ausente	Total
Casos	a	b	a + b
Control	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	

a= número de pacientes con el factor de riesgo (alelo, genotipo, combinación)

b= número de pacientes sin el factor de riesgo

c= número de individuos sanos con el factor de riesgo

d= número de individuos sanos sin el factor de riesgo.

RESULTADOS

Características de los grupos estudiados.

En el estudio se incluyeron ciento treinta y dos (n=132) individuos venezolanos, no relacionados, mayores de 65 años, clasificados en 2 grupos.

Casos (n=55): individuos con diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío o esporádico, diagnosticados de acuerdo a los criterios del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos, de la Comunicación y de Accidentes Vasculares Cerebrales y los criterios de la Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Conexos (McKhann y col., 1984).

Controles (n=77): individuos aparentemente sanos, sin ningún tipo de demencia de acuerdo al miniexamen mental de Folstein (Folstein, Folstein y McHugh, 1975).

Calidad del ADN genómico.

Luego ajustar la concentración de las muestras de ADN genómico a 200 $\mu\text{g/ml}$, se procedió a realizar la visualización de los geles de agarosa al 0,75% en TBE 1X en los cuales se utilizó bromuro de etidio como colorante para la detección de las bandas de ADN en el gel. Esto permitió confirmar si el ADN estaba ajustado a la concentración deseada al compararlo con un patrón ajustado a 200 $\mu\text{g/mL}$ (Fago Lambda). Además, permitió evidenciar que el ADN genómico obtenido de las muestras de sangre periférica y almacenado por más de 10 años no estaba degradado (Figura 4).

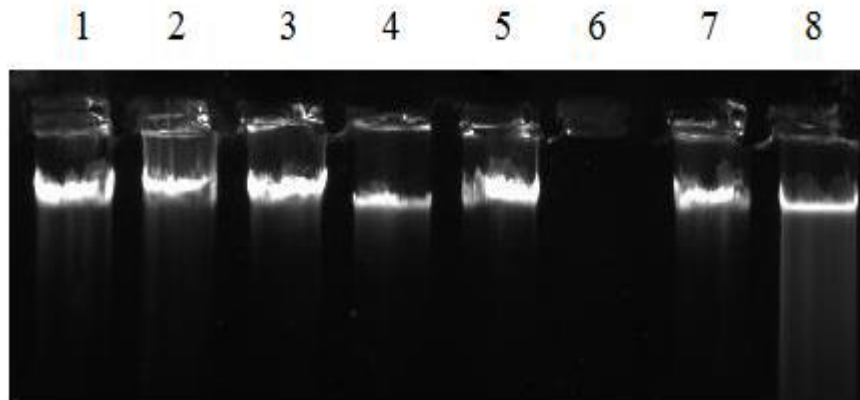


Figura 4. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X. El carril 1 corresponde al fago lambda ajustado a 200 µg/mL (marcador de referencia), los carriles 2 al 8 corresponden a las muestras de ADN de algunos de los individuos incluidos en el estudio. En el carril 6 no se sembró ninguna muestra de ADN.

Asignación del alelo *HPI* por el método de la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencias específicas (PCR-SSP).

Para detectar la presencia del alelo *HPI* se utilizó la técnica de PCR-SSP con las condiciones descritas en la metodología. La asignación del alelo se basó en la visualización, en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, de una banda de 1757 pb correspondiente al alelo *HPI*. Cabe destacar, que en todas las muestras analizadas se observó una banda de 419 pb, correspondiente al control interno (*ABO*) (Figura 5).

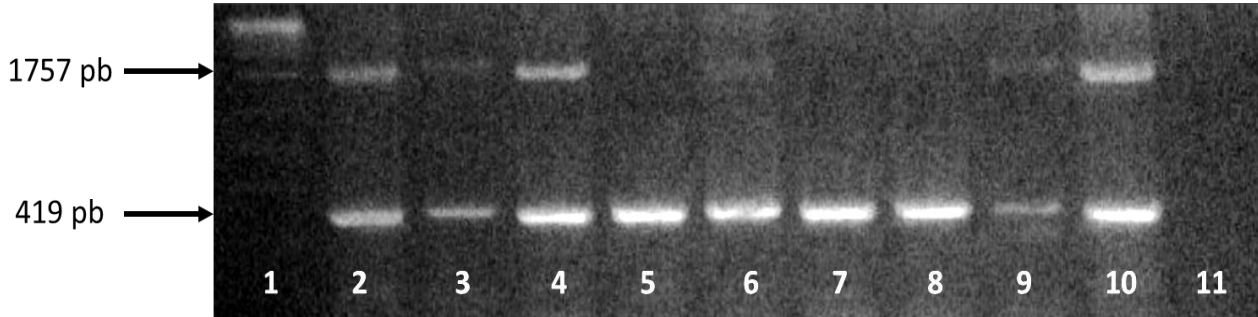


Figura 5. Visualización de los productos amplificados para el alelo *HP1* en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular (TM), los carriles del 2 al 9 corresponden a muestras de individuos incluidos en el estudio. Los carriles 2 al 4, 6 y 9 presentan la banda de 1757 pb, correspondiente al alelo *HP1*. El carril 10 corresponde al control positivo (CP) y el carril 11 al control negativo (CN). En los carriles del 2 al 10 se observa la banda de 419 pb, correspondientes al control interno *ABO*.

Asignación del alelo *HP2* por el método de la reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencias específicas (PCR-SSP).

Para detectar la presencia del alelo *HP2* se utilizó la técnica de PCR-SSP con las condiciones descritas en la metodología. La asignación del alelo se basó en la visualización, en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, de una banda de 349 pb correspondiente al alelo *HP2*. Cabe destacar, que en todas las muestras analizadas se observó una banda de 419 pb, correspondiente al control interno (*ABO*) (Figura 6).

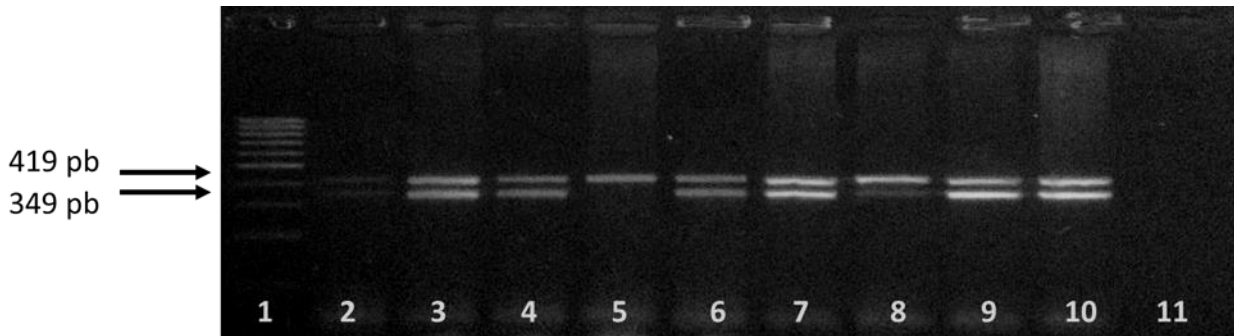


Figura 6. Visualización de los productos amplificados para el alelo *HP2* en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular (TM), los carriles del 2 al 9 corresponden a muestras de individuos incluidos en el estudio. Los carriles 2 al 4, 6 al 9 presentan la banda de 349 pb, correspondiente al alelo *HP2*, la cual está ausente en el carril 5, indicando que este individuo no posee el alelo *HP2*. El carril 10 corresponde al control positivo (CP) y el carril 11 al control negativo (CN). En los carriles del 2 al 10 se observa la banda de 419 pb, correspondientes al control interno *ABO*.

Asignación de los genotipos *HP*.

La asignación de los genotipos de *HP* se realizó, tanto en los pacientes como controles, considerando la presencia de bandas en los geles de agarosa. El genotipo *HP1-1* se identificó por la presencia de una única banda de 1757 pb, el genotipo *HP2-1* por la presencia de dos 2 bandas, una de 1757 pb (correspondiente al alelo *HP1*) y otra de 349 pb (correspondiente al alelo *HP2*). Finalmente, el genotipo *HP2-2* por la presencia de una única banda de 349 pb.

Estimación del equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) para los genotipos de *HP* en individuos sanos y con enfermedad de Alzheimer.

El análisis realizado permitió establecer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen *HP*. En los pacientes (n=55) y controles (n=77) se pudo constatar la existencia del equilibrio de Hardy-Weinberg, para la distribución genotípica del polimorfismo del gen *HP*, es decir, no se observaron diferencias entre las frecuencias esperadas y observadas para cada genotipo (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos.

Genotipo HP	Pacientes EA Frecuencia Observada	Pacientes EA Frecuencia Esperada	Genotipo HP	Controles Frecuencia Observada	Controles Frecuencia Esperada
<i>HP1-1</i>	5	3	<i>HP1-1</i>	12	9
<i>HP2-1</i>	14	19	<i>HP2-1</i>	29	35
<i>HP2-2</i>	36	34	<i>HP2-2</i>	36	33
Total Individuos	55	55	Total Individuos	77	77

Pacientes: $X^2 = 3.54$, $p = 0.06$; **Controles:** $X^2 = 2.11$, $p = 0.15$.

Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen APOE en pacientes con EA de inicio tardío e individuos aparentemente sanos.

Debido a que muchas muestras de ADN estaban degradadas, se re-analizó la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del gen APOE en los pacientes con EA ($n=55$) y en los controles ($n=77$). Observándose, la presencia de los tres alelos [$\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$] en ambos grupos. Asimismo, en los pacientes y en los individuos aparentemente sanos se observó cuatro genotipos APOE [$\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$] de los seis genotipos posibles. Al establecer comparaciones de frecuencias entre los grupos, se observó en los pacientes con EA una frecuencia significativamente incrementada de los genotipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ (OR: 2.75, IC 95%: 1.27-6.03, $p = 0.004$, $pc = 0.016$) y $\epsilon 4/\epsilon 4$ (OR: 3.6, IC 95%: 1.03-12.27, $p = 0.01$, $pc = 0.04$) con respecto a los controles. En contraste, en los individuos aparentemente sanos los genotipos $\epsilon 2/\epsilon 3$ (OR: 0.1, IC 95%: 0.01-0.79, $p = 0.004$, $pc = 0.016$) y $\epsilon 3/\epsilon 3$ (OR: 0.48, IC 95%: 0.23-0.98, $p = 0.02$, $pc = 0.08$) presentaban una frecuencia significativamente mayor con respecto a los pacientes. Los valores de p permanecieron significativos después de corregirlos, excepto para el valor de p obtenido al comparar la frecuencia del genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ entre los grupos.

Con respecto a la frecuencia de los alelos, se observó en los individuos sanos una frecuencia significativamente incrementada del alelo $\epsilon 2$ (OR: 0.11, IC 95%: 0.01-0.85, $p = 0.005$,

pc: 0.015) y del alelo $\epsilon 3$ (OR: 0.49, IC 95%: 0.29-0.85, p: 0.005, pc: 0.015) con respecto a los pacientes con EA. En contraste, la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ se observó significativamente incrementada en pacientes con EA con respecto a los individuos sanos (OR: 3.25, IC 95%: 1.80-5.87, p: 0.00003, pc: 0.00009) (Tabla 4). Los valores de p permanecieron significativos después de corregirlos.

Tabla 4. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen *APOE* en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos.

Genotipos <i>APOE</i>	Pacientes EA (n=55)	Controles (n=77)	OR IC 95%	<i>p</i>	<i>pc</i>
$\epsilon 2/\epsilon 3$	1.8 (1)	15.6 (12)	0.1 (0.01-0.79)	0.004	0.016
$\epsilon 3/\epsilon 3$	41.8 (23)	59.7 (46)	0.48 (0.23-0.98)	0.02	ns
$\epsilon 3/\epsilon 4$	40.0 (22)	19.5 (15)	2.75 (1.27-6.03)	0.004	0.016
$\epsilon 4/\epsilon 4$	16.4 (9)	5.2 (4)	3.6 (1.03-12.27)	0.01	0.04
Alelos <i>APOE</i>					
$\epsilon 2$	0.9 (1)	7.8 (12)	0.11 (0.01-0.85)	0.005	0.015
$\epsilon 3$	62.7 (69)	77.3 (119)	0.49 (0.29-0.85)	0.005	0.015
$\epsilon 4$	36.4 (40)	14.9 (23)	3.25 (1.80-5.87)	0.00003	0.00009

Nota: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo o el número de veces que se repite el alelo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza, p: probabilidad, pc: valor de p corregido, ns: no significativo ($p > 0.05$)

Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del gen *HP* en pacientes con EA de inicio tardío e individuos aparentemente sanos.

En la tabla 5 se muestra la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *HP* en los pacientes y en individuos aparentemente sanos. Como se puede observar ambos grupos poseen los tres genotipos *HP*, presentando el genotipo *HP2-2* la mayor frecuencia en ambos grupos (65% pacientes vs. 47 % sanos). Sin embargo, al establecer comparaciones de las frecuencias de los genotipos entre los grupos estudiados, se observó una frecuencia significativamente incrementada del genotipo *HP2-2* en los individuos con EA versus los individuos sanos (65% vs. 47%, respectivamente, OR: 2.15; IC 95%: 1.05-4.40; p: 0,017; pc: 0,031). Los valores de p permanecieron significativos después de corregirlos.

Con respecto a la frecuencia de los alelos del gen *HP*, se observó que el alelo *HP2* es el más frecuente en ambos grupos y al establecer comparaciones se observó una frecuencia significativamente incrementada del alelo *HP1* en los individuos sanos versus pacientes con EA (34% vs. 22%, respectivamente, OR: 0.53; IC 95%: 0.30-0.93; p: 0,013; pc: 0,026) y una frecuencia significativamente incrementada del alelo *HP2* en los pacientes con EA versus individuos sanos (78% vs. 66%, respectivamente, OR: 1.88; IC 95%: 1.07-3.29; p: 0,013; pc: 0,026). Los valores de p permanecieron significativos después de corregirlos.

Tabla 5. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del gen *HP* en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos.

Genotipos <i>HP</i>	Pacientes EA (n=55)	Controles (n=77)	OR IC 95%	<i>P</i>	<i>pc</i>
<i>HP1-1</i>	9.0 (5)	16.0 (12)	0.54 (0.18-1.64)	ns	ns
<i>HP2-1</i>	25.0 (14)	38.0 (29)	0.56 (0.26-1.21)	ns	ns
<i>HP2-2</i>	65.0 (36)	47.0 (36)	2.15 (1.05-4.4)	0.017	0.031
Alelos <i>HP</i>					
<i>HP1</i>	22 (24)	34 (53)	0.53 (0.30-0.93)	0.013	0.026
<i>HP2</i>	78 (86)	66 (101)	1.88 (1.07-3.29)	0.013	0.026

Nota: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo o el número de veces que se repite el alelo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza, p: probabilidad, pc: valor de p corregido, ns: no significativo ($p > 0.05$).

Análisis del efecto combinado del polimorfismo del gen *HP* y los polimorfismos del gen *APOE*.

Determinadas las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen *HP* y con la información del polimorfismo del gen *APOE* de los individuos que participaron en este estudio, se determinó si habían combinaciones que estuviesen asociadas (positiva o negativamente) con la enfermedad de Alzheimer (Tabla 6).

Al establecer comparaciones de frecuencias de las combinaciones *HP/APOE* entre los grupos estudiados, se observó una frecuencia incrementada de la combinación genotípica *HP1-1/ε3ε3* (OR: 0.14, IC 95%: 0.02-1.14, p: 0.018) en los controles con respecto a los pacientes con EA, sugiriendo que la presencia de ambos genotipos protegen contra el desarrollo de la EA

(asociación negativa: protectora). Por el contrario, se observó una frecuencia incrementada de las combinaciones genóticas *HP1-1/ε4ε4* (OR: 7.2, IC 95%: 0.34-153.87, p: 0.034), *HP2-2/ε3ε4* (OR: 3.5, IC 95%: 1.39-9.01, p: 0.003) y *HP2-2/ε4ε4* (OR: 3.6, IC 95%: 0.89-14.59, p: 0.03) en los paciente con respecto a los controles, sugiriendo que estas combinaciones confieren susceptibilidad a desarrollar EA (asociación positiva).

Tabla 6. Frecuencias de las combinaciones genóticas *HP/APOE* en pacientes con EA e individuos sanos.

Genotipos <i>HP/APOE</i>	Pacientes EA (n=55)	Controles (n=77)	OR IC 95%	P	Asociación
<i>HP1-1/ε2ε3</i>	0	2.6 (2)	0.27 (0.01-5.78)	ns	-
<i>HP1-1/ε3ε3</i>	1.8 (1)	11.7 (9)	0.14 (0.02-1.14)	0.018	Negativa
<i>HP1-1/ε3ε4</i>	3.6 (2)	1.3 (1)	2.8 (0.25-32.44)	ns	-
<i>HP1-1/ε4ε4</i>	3.2 (2)	0	7.2 (0.34-153.87)	0.034	Positiva
<i>HP2-1/ε2ε3</i>	1.8 (1)	7.8 (6)	0.22 (0.03-1.87)	ns	-
<i>HP2-1/ε3ε3</i>	16.4 (9)	20.8 (16)	0.75 (0.30-1.84)	ns	-
<i>HP2-1/ε3ε4</i>	7.3 (4)	7.8 (6)	0.93 (0.25-3.46)	ns	-
<i>HP2-1/ε4ε4</i>	0	1.3 (1)	0.46 (0.02-11.45)	ns	-
<i>HP2-2/ε2ε3</i>	0	5.6 (4)	0.15 (0.008-2.79)	ns	-
<i>HP2-2/ε3ε3</i>	23.6 (13)	27.3 (21)	0.83 (0.37-1.84)	ns	-
<i>HP2-2/ε3ε4</i>	29.1 (16)	10.4 (8)	3.5 (1.39-9.01)	0.003	Positiva
<i>HP2-2/ε4ε4</i>	12.7 (7)	3.4 (3)	3.6 (0.89-14.59)	0.03	Positiva

Nota: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores de

la combinación genotípica. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza, p: probabilidad, ns: no significativo ($p > 0.05$), nd: no determinado.

DISCUSION

En la actualidad los científicos se han enfocado en el análisis genético de las causas de enfermedades complejas, lo que ha conllevado a la identificación de genes relacionados con la mayoría de estas patologías. Estos análisis han permitido a los científicos acceder a los orígenes endógenos de las enfermedades. La era actual de la genómica, en adición de la transcriptómica, proteómica y metabolómica, ha permitido el estudio de genes involucrados en distintas etapas del desarrollo humano, desde la fecundación hasta la muerte, proporcionando una imagen más completa de la biología ser humano. El análisis genético ha permitido el desarrollo de modelos para entender rutas y mejorar diagnósticos tempranos, en estados pre-sintomáticos, de distintas patologías. Sin embargo, no existen tratamientos basados en terapia génica, a pesar de los esfuerzos actuales que se están acercando a conseguir soluciones potenciales (Tropea y Harkin, 2017).

Existe un consenso, en la comunidad científica, en el cual se indica que un acercamiento multi-nivel es requerido para descubrir los mecanismos de función cerebral que proporcionen rutas para el desarrollo de nuevos tratamientos en desórdenes mentales (Tropea y Harkin, 2017). Además, estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han revelado la existencia de enfermedades poligénicas, en la que múltiples genes contribuyen con el riesgo de manera acumulativa (Tropea y Harkin, 2017), como por ejemplo la EA de inicio tardío.

Hasta la fecha, el diagnóstico de EA está basado en un criterio de exclusión clínico, resultando en un diagnóstico probable de EA, reflejando características clínicas comunes entre la demencia tipo EA y las demencias tipo no EA (Abraham y col., 2010).

No existe un método biológico *ante mortem* confiable para diferenciar demencias de tipo EA y no EA. Sin embargo, para mejorar el diagnóstico de la EA se han llevado a cabo estudios proteómicos, con la finalidad de identificar biomarcadores potenciales específicos que estén involucrados en procesos fisiológicos generales, tales como la inflamación, neuroprotección, vascularización o estrés oxidativo (Revisado en Abraham y col., 2010).

No obstante, los estudios indican que el componente hereditario de la enfermedad de Alzheimer está entre un 60 y 80%, por lo que varios factores de riesgo quedan por ser descubiertos. Bajo la hipótesis de que una enfermedad común debe estar condicionada al efecto

de variantes comunes (aquellas con una frecuencia alélica del alelo mutado por encima del 5%), estudios GWAS han identificado hasta 20 loci que incrementan el riesgo de una persona de padecer EA. Estos estudios fueron importantes porque sugirieron nuevas rutas metabólicas que pudiesen estar alteradas en la EA, como por ejemplo, el metabolismo de lípidos, la respuesta inflamatoria y la endocitosis (Fernández y Cruchaga, 2016).

Como producto de estos estudios se han identificado biomarcadores potenciales en la EA, uno de ellos es la haptoglobina debido a que presenta perfiles proteómicos específicos en diferentes tipos de demencia (Verdier, 2007; Abraham y col., 2010). Abraham y colaboradores mostraron que la Hp puede estar involucrada en la fisiopatología de EA de forma diferente a la forma en que puede contribuir en otros tipos de demencia, como por ejemplo la demencia frontotemporal o la demencia vascular (Abraham y col., 2010).

La presencia de Hp en el CSF de pacientes con EA puede estar asociada con una función alterada de la barrera hemato-encefálica o con su producción *in situ*. Por lo tanto, se puede asumir que la Hp podría ejercer en el cerebro una función protectora contra el daño oxidativo inducido por Hb. Las propiedades biofísicas y bioquímicas y, por tanto, su función de limpieza, dependen de su fenotipo (Revisado en Abraham y col., 2010). De este modo las personas sanas con genotipos *HP1-1* producen mayores concentraciones de la proteína, seguidos por los genotipos heterocigotos *HP2-1* y los genotipos *HP2-2* (Langlois y Delanghe, 1996). Del mismo modo, la afinidad de la Hp por la Hb disminuye con el número de alelos $\alpha 2$, por lo tanto, los individuos *HP2-2* son más susceptibles a patologías inducidas por estrés oxidativo. De esta manera, la limpieza de Hb por Hp puede jugar un papel importante en la fisiopatología de la EA, ya que se ha demostrado que la Hb se asocia fuertemente con el A β , guiando a la inducción de la actividad peroxidasa y promoviendo la formación de oligómeros de A β (Revisado en Abraham y col., 2010).

Considerando el posible papel de la Hp en la fisiopatología de la EA, en el presente estudio se determinó la frecuencia de los genotipos del polimorfismo del gen *HP* y se correlacionó con los polimorfismos *rs429358* y *rs7412* del gen *APOE* en pacientes con Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

Análisis del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Al analizar la distribución de frecuencia de los genotipos del polimorfismo del gen *HP* en los individuos aparentemente sanos (controles) y pacientes con EA, se observó que la misma se encuentra en equilibrio en ambos grupos, indicando que cumplen con las hipótesis del equilibrio de Hardy-Weinberg. Estas hipótesis son:

- (1) El apareamiento en la población es aleatorio.
- (2) La población es infinitamente grande o posee un tamaño lo suficientemente grande, por lo tanto las fluctuaciones en frecuencias de alelos y genotipos son pequeñas.
- (3) La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).
- (4) No hay diferencias de competencias entre genotipos (Ryckman y Williams, 2008).

Aunque históricamente la fórmula del EHW fue desarrollado para examinar la transmisión de los alelos de una generación a otra en una población, el uso de los conceptos del EHW ha sido expandido en estudios de asociación para detectar errores de genotipaje, que pudiesen causar resultados falsos positivos o falsos negativos (Ryckman y Williams, 2008). Por lo tanto, podemos asumir que no hubo errores de genotipaje en nuestro estudio y que las asociaciones encontradas no son falsas.

Asociación de los genotipos y alelos de los polimorfismos *rs429358* y *rs7412* del gen *APOE* y el riesgo a padecer EA.

Al analizar la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *APOE*, se observó en los pacientes con EA una frecuencia significativamente incrementada de los genotipos ϵ_3/ϵ_4 y ϵ_4/ϵ_4 y del alelo ϵ_4 . En contraste, en los individuos aparentemente sanos los genotipos ϵ_2/ϵ_3 , ϵ_3/ϵ_3 y los alelos ϵ_2 y ϵ_3 presentaban una frecuencia significativamente mayor. Corroborando estos resultados lo descrito previamente en la literatura.

El alelo ϵ_4 constituye el factor de riesgo genético más fuerte en la EA de inicio tardío, con una frecuencia de alrededor del 20% en la población, pero aproximadamente del 65% en los casos de EA (Corder y col., 1994; Kim y col., 2009; Liu y col., 2013). Igualmente, el alelo ϵ_4 se ha correlacionado con una edad de inicio más temprana y una mayor incidencia de EA de inicio

tardío, mientras que el alelo $\epsilon 2$ al parecer disminuye la incidencia o retrasa el inicio de la enfermedad (Aleshkov y col., 1997; Liu y col., 2013; Apostolova y col., 2014).

Como se indicó anteriormente, la presencia del alelo $\epsilon 4$ incrementa la prevalencia de EA y reduce la edad de aparición de la enfermedad de una manera dosis dependiente (Corder y col., 1993; Farrer y col., 1997). Es decir, entre los individuos homocigotos para el alelo $\epsilon 4$ (dos dosis del alelo $\epsilon 4$) la frecuencia de EA es del 91% y la edad media del inicio clínico de 68 años, en comparación con un 47% y 76 años de edad en individuos heterocigotos para el alelo $\epsilon 4$ (una dosis del alelo $\epsilon 4$) y un 20% y 84 años en los no portadores del alelo $\epsilon 4$ (Corder et al., 1993).

Es importante destacar que la deposición de $A\beta$ como placas seniles es más abundante en los individuos portadores del alelo $\epsilon 4$ en comparación con los individuos no portadores de este alelo. Además, el alelo $\epsilon 4$ aumenta la deposición del $A\beta$ en el cerebro de sujetos ancianos con función cognitiva normal, siendo esta asociación más débil que la descrita en los pacientes con EA (Revisado en Kanekiyo, Xu y Bu, 2014).

Las isoformas de ApoE difieren en la estabilidad de sus dominios amino-terminales, siendo ApoE4 la menos resistente a la desnaturalización térmica y química, ApoE2 la más resistente y ApoE3 mostrando una resistencia intermedia. Estos estudios sugieren que en individuos portadores del alelo $\epsilon 4$ y los pacientes con EA presentan concentraciones reducidas de ApoE, lo que facilitaría la acumulación del $A\beta$ en el cerebro. No obstante, el análisis de las concentraciones de $A\beta$ y ApoE en múltiples áreas cerebrales de individuos sin demencia, ha demostrado que las concentraciones de ApoE se correlacionan negativamente con las concentraciones del $A\beta$, tanto en portadores y no portadores de $\epsilon 4$, indicando que la ApoE afecta las concentraciones del $A\beta$ de manera región específica, evitando la acumulación del $A\beta$. En consecuencia, estos estudios sugieren que las isoformas de ApoE impactan en la patogénesis de la EA al afectar el metabolismo y la agregación de $A\beta$ (Revisado en Kanekiyo y col., 2014).

Numerosos estudios han analizado los efectos de la ApoE en la agregación del $A\beta$ *in vitro*. Sin embargo, las conclusiones han sido controversiales, ya que la ApoE puede facilitar o inhibir la agregación del $A\beta$. A pesar de ello, se ha demostrado que altas concentraciones de la ApoE forman co-agregados de alto peso molecular con el $A\beta$, donde ApoE4 probablemente promueve la agregación del $A\beta$ más que la ApoE3. Conjuntamente, se ha demostrado que la ApoE aumenta la concentración de oligómeros del $A\beta$ de una forma isoforma dependiente

(ApoE4 > ApoE3 > ApoE2) y que la ApoE4 estabiliza los oligómeros del A β más que ApoE3. Por lo tanto, la ApoE4 acelera la agregación del A β en la EA. (Revisado en Kanekiyo y col., 2014).

Resumiendo, el A β es generado predominantemente en neuronas y es eliminado a través de tres vías principales, que incluyen: 1) la degradación proteolítica por endopeptidasas, 2) la eliminación celular a través de la degradación lisosomal en células del parénquima cerebral (microglia, astrocitos, neuronas) y 3) por depuración mediada por el sistema cerebrovascular, incluyendo el drenaje vía líquido intersticial y la barrera hemato-encefálica. La perturbación de estas vías induce la acumulación del A β y su depósito en el parénquima cerebral, como placas amiloides, y en la región perivascular, como angiopatía amiloide cerebral (CAA). Esta deposición del A β es exacerbada por la ApoE4 en comparación con la ApoE3. Por otra parte, la ApoE, que es generada principalmente por las células gliales, se va encontrar con el A β en todas estas vías. En consecuencia, es probable que la ApoE facilite la limpieza del A β , activando su degradación enzimática y su fagocitosis, de una forma dependiente de la isoforma (ApoE3 > ApoE4). Sin embargo, la ApoE también podría suprimir la limpieza del A β (ApoE4 > ApoE3) al competir con el A β por la unión a receptores o reteniendo su eliminación a través de la barrera hemato-encefálica. (Figura 7). (Revisado en Kanekiyo y col., 2014).

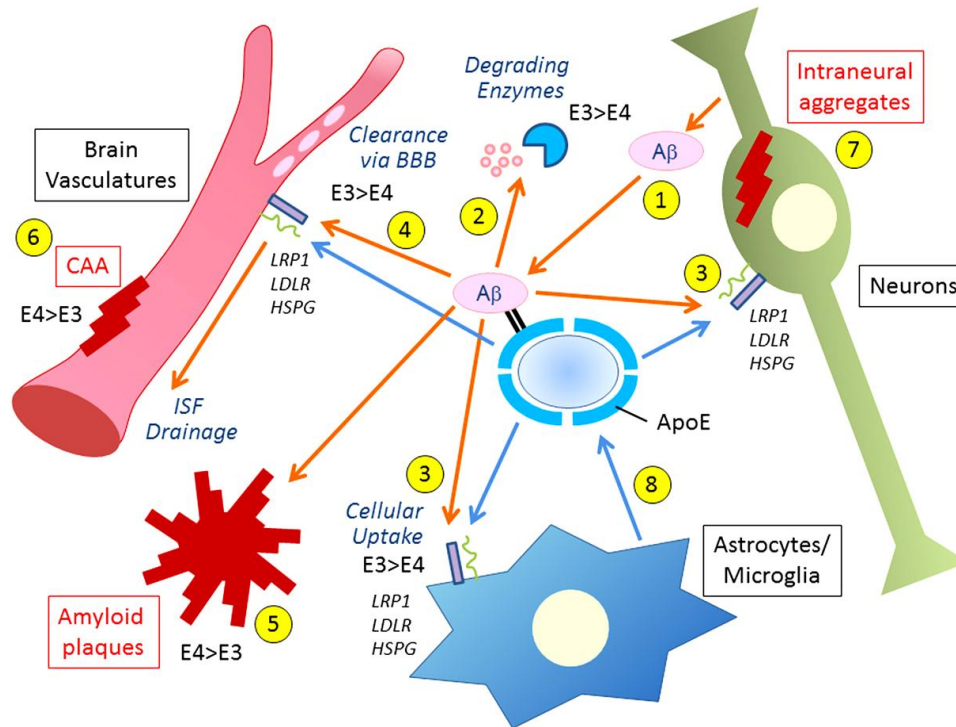


Figura 7. Principales vías de eliminación de A β y efectos de las isoformas de ApoE. El A β es generado predominantemente en neuronas (1) y es eliminado a través de tres vías principales, incluyendo: la degradación proteolítica por endopeptidasas (2), la eliminación celular a través de la degradación lisosomal en células del parénquima cerebral (microglia, astrocitos, neuronas) (3) y el drenaje vía líquido intersticial (ISF), donde es degradado por células vasculares, o transportado fuera del cerebro a través de la barrera hemato-encefálica (BBB) (4). La perturbación de estas vías induce la acumulación del A β y su depósito en el parénquima cerebral, como placas amiloides (5), y en la región perivascular, como angiopatía amiloide cerebral (CAA) (6), y algunas veces dentro de la neurona. La ApoE es generada principalmente por las células gliales (8) y se va encontrar con el A β en todas estas vías. Es probable que la ApoE facilite la limpieza del A β , activando su degradación enzimática (2) y su fagocitosis (3), de una forma dependiente de la isoforma (ApoE3 > ApoE4). Sin embargo, la ApoE podría suprimir la limpieza del A β (apoE4 > apoE3) al competir con el A β por la unión a receptores o reteniendo su eliminación a través de la BBB (4). ApoE4 exacerba la deposición del A β , como placas amiloides (5) y la formación de CAA (6), en comparación con ApoE3. LRP1, LDLR y HSPG (proteoglicanos heparán sulfato), son expresados en todas las vías de eliminación celular del A β , regulando su limpieza directamente o a través de ApoE. (Revisado en Kanekiyo y col., 2014).

Asociación entre el polimorfismo del gen *HP* y el riesgo a padecer EA

El análisis de las comparaciones de las frecuencias de los genotipos del gen *HP*, mostró una frecuencia significativamente incrementada del genotipo *HP2-2* (OR: 2.15; IC 95%: 1.05-

4.40; pc: 0,031) y del alelo *HP2* (OR: 1.88; IC 95%: 1.07-3.29; pc: 0,026) en los pacientes con EA. Por el contrario, en los individuos sanos el análisis mostró una frecuencia significativamente incrementada del alelo *HP1* (OR: 0.53; IC 95%: 0.30-0.93; pc: 0,026). Estos resultados sugieren que la presencia del alelo *HP2* y del genotipo homocigoto *HP2-2* confiere dos veces mayor riesgo a desarrollar EA, mientras que la presencia del alelo *HP1* protege contra el desarrollo de esta patología.

La haptoglobina es una proteína de fase aguda producida por el hígado, la cual elimina la Hg libre y sus subproductos, atenuando así los efectos oxidativo e inflamatorios de la hemoglobina. Se ha demostrado que la Hp actúa tanto en complejo con la Hb como de manera independiente, ejerciendo varias propiedades funcionales, incluyendo actividades antioxidantes y antiinflamatorias y la capacidad de participar en la regulación del sistema inmunitario (Song y col., 2015). Por otra parte, la Hp fue identificada como un marcador de disfunción de la barrera hemato-encefálica, produciéndose en el cerebro en respuesta a diferentes estímulos de estrés (Revisado en Spagnuolo y col., 2014a). Por lo tanto, las altas concentraciones de Hp, en el suero y el CSF de pacientes con EA, apoya la hipótesis que el estrés oxidativo y la neuroinflamación puede jugar un papel importante en la EA (Song y col., 2015).

Las investigaciones relacionadas con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer se han centrado en el papel del estrés oxidativo, es decir, en el desbalance entre la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), y su eliminación, debido al alto consumo energético y al bajo nivel de defensa antioxidante del sistema nervioso central. En el cerebro con EA los sistemas antioxidantes son menos funcionales, pudiendo guiar a un incremento de las ERO y de las ERN que reaccionarían con biomoléculas, incluyendo proteínas, lípidos, carbohidratos, ADN y ARN, provocando alteraciones en su estructura y la pérdida de sus funciones (Revisado en: De Mendonça, Salazar y **Fernández-Mestre**, 2016). Por lo demás, se ha descrito que la Hp posee actividad antioxidante por sí sola y en complejo con la Hb, evitando así el daño oxidativo tisular y se ha demostrado que el efecto protector de la Hp contra estrés oxidativo es fenotipo dependiente. Observándose que los individuos con fenotipo Hp1-1 desarrollan una mayor actividad protectora contra radicales libres, con respecto a los individuos con fenotipo Hp2-2 (Gueye y cols., 2006). Esta capacidad variable de los fenotipos de Hp para prevenir el estrés oxidativo, podría estar relacionado a las diferencias en la afinidad de la Hp por

la Hb, siendo el fenotipo Hp1-1 el que posee mayor afinidad de unión a la Hb, disminuyendo la disponibilidad de hierro en circulación y, por ende, la producción de radicales libres (Sadzadeh y Bozorgmehr, 2004). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la afinidad de los tres fenotipos de Hp es la misma y que la diferencia en el grado de protección contra estrés oxidativo estaría dada por su tamaño y la capacidad de atravesar la barrera de las células endoteliales (Melamed y cols., 2001).

Considerando lo planteado anteriormente, podemos sugerir que la menor actividad antioxidante de la Hp2-2 explicaría la asociación positiva del genotipo *HP2-2* y el alelo *HP2* con la susceptibilidad a desarrollar EA, mientras que la mayor actividad antioxidante de la Hp1-1 explicaría la protección conferida por el alelo *HP1*.

Aunque los mecanismos responsables de las manifestaciones de la EA no han sido elucidados, recientemente surgió un consenso de que la neuroinflamación juega un papel importante en esta patología. En el sistema nervioso central, los mecanismos de inflamación son llevados a cabo por la activación de los astrocitos y microglías, resultando en la producción de mediadores neurotóxicos, tales como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, enzimas proteolíticas, glutamato, factores de complemento o citoquinas inflamatorias (Doens y Fernández, 2014). No obstante, la activación de las microglías por agregados del A β puede poseer un papel de neuroprotección, a través de la eliminación del A β vía fagocitosis y degradación proteolítica, y puede, además, contribuir con la neurodegeneración progresiva (revisado en: Tahara y col., 2006). Además, muchos tejidos envejecidos, como el cerebro, se caracterizan por una inflamación crónica de bajo nivel. Sin embargo, las microglías envejecidas desarrollan un fenotipo pro-inflamatorio incrementado, caracterizado por una respuesta inflamatoria exacerbada a estímulos externos y/o internos (Go y col., 2016).

En la Figura 8 se representa un modelo para explicar el papel de la Hp en la inflamación. En este modelo, las señales de peligro en células estresadas inducen la expresión de interleuquina-6 (IL-6), la cual a su vez induce la expresión de Hp. En individuos Hp1-1, la Hp reduce significativamente la generación de especies reactivas de oxígeno a través de su potente función antioxidante, mayor capacidad de unión de la Hb y a su actividad anti-inflamatoria, desencadenándose una respuesta Th2 dominante (anti-inflamatoria), involucrada en la curación

y reparación tisular. En contraste, en individuos Hp2-2 la eliminación lenta de especies reactivas de oxígeno permitiría la persistencia del estímulo inflamatorio, aumentando el estrés oxidativo y desencadenándose una respuesta Th1 dominante (pro-inflamatoria) (Revisado en: Quaye, 2008).

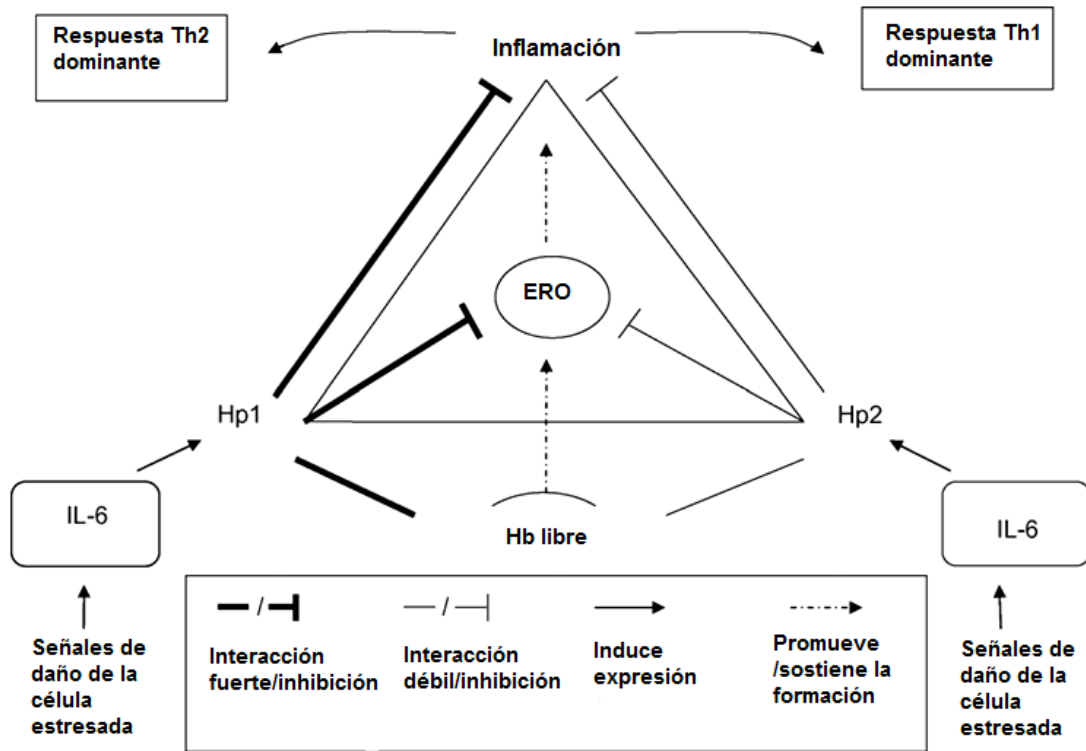


Figura 8. Modelo del papel de la haptoglobina (Hp) en la respuesta inflamatoria. Las señales de peligro de las células estresadas inducen la expresión de IL-6, que a su vez induce la expresión de Hp. La fuerte capacidad de unión a la hemoglobina (Hb), alta capacidad antioxidante y anti-inflamatoria de la Hp1 conduce a una respuesta Th2 dominante. Mientras que la menor capacidad de unión a la hemoglobina (Hb), capacidad antioxidante disminuida y mayor actividad pro-inflamatoria de la Hp2 conduce a una respuesta Th1 dominante. ERO: especies reactivas de oxígeno (Figura tomada y modificada de: Quaye, 2008).

Por lo tanto, la mayor actividad pro-inflamatoria de la Hp2-2 explicaría la asociación positiva del genotipo *HP2-2* y el alelo *HP2* con la susceptibilidad a desarrollar EA, mientras que la mayor actividad anti-inflamatoria de la Hp1-1 explicaría la protección conferida por el alelo *HP1*. En consecuencia, la falla en la resolución de la neuroinflamación, es decir, el paso de un estado pro-inflamatorio a un estado anti-inflamatorio (pro-resolución), conduciría a un estado de

inflamación crónica, implicado en la patogénesis de la EA (Whittington, Planel y Terrando, 2017).

Correlación de los genotipos del polimorfismo del gen *HP* con los genotipos (*rs429358y rs7412*) del gen *APOE* y el riesgo a padecer EA.

Las comparaciones entre los grupos mostró asociaciones negativas (protectoras) y positivas (susceptibilidad) entre genotipos *HP/APOE* y el desarrollo de EA. Por ende, para verificar si había un efecto aditivo o sinérgico entre los genotipos *HP* y la presencia (+) o ausencia (-) del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*, se establecieron las comparaciones indicadas en la tabla 7. Como se puede observar la presencia del alelo $\epsilon 4$ en los individuos con el genotipo *HP2-2* confiere 3.5 veces mayor riesgo a desarrollar EA (asociación positiva). Sin embargo, la ausencia del alelo $\epsilon 4$ en los individuos con el genotipo *HP2-2* revierte la asociación de positiva a negativa, es decir en lugar de conferir susceptibilidad, esta combinación confiere protección. Además, cabe destacar, que el OR conferido por el alelo $\epsilon 4$ permanece igual en ausencia o presencia del genotipo *HP2-2*, mientras que el OR conferido por el genotipo *HP2-2* incrementa de 2 a 3.5 veces en presencia del alelo $\epsilon 4$. Por consiguiente, los resultados obtenidos indican que el genotipo *HP2-2* está asociado con un riesgo incrementado a desarrollar EA de inicio tardío, especialmente en pacientes que portan el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*.

Tabla 7. Comparaciones de frecuencias del genotipo *HP2-2/ε4-* y *HP2-2/ε4+* entre pacientes y controles

Genotipos <i>HP/APOE</i>	Pacientes EA (n=36)	Controles (n=36)	OR IC 95%	p
<i>HP2-2/ε4-</i>	36.1 (13)	69.4 (25)	0.24 (0.09-0.66)	0.002
<i>HP2-2/ε4+</i>	63.9 (23)	30.6 (11)	4.0 (1.50-10.74)	0.002

Nota: Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores de la combinación *HP/APOE*. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza, p: probabilidad.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que:

1. El alelo $\epsilon 4$ es el principal factor de riesgo para desarrollar EA de inicio tardío.
2. La menor actividad antioxidante y mayor reactividad inflamatoria del fenotipo Hp 2-2 (perfil de citoquina Th1) confiere susceptibilidad al desarrollo de la EA. Corroborando que el estrés oxidativo y la neuroinflamación juegan un papel importante en esta patología.
3. La mayor actividad antioxidante y menor reactividad inflamatoria del fenotipo Hp1-1 posiblemente protege contra el desarrollo de la EA.
4. La asociación del polimorfismo del gen *HP* no es independiente de la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*.

Finalmente, es importante destacar que existen otros genes relacionados con estrés oxidativo y neuroinflamación, los cuales pudiesen estar involucrados en la susceptibilidad a desarrollar la Enfermedad de Alzheimer, y probablemente la variabilidad genética de dichos genes juegan un papel relevante en el desarrollo de esta patología.

CONCLUSIONES

1. El alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* representa el principal factor de riesgo para desarrollar EA de inicio tardío.
2. El polimorfismo del gen *HP* está asociado con el desarrollo de de la EA de inicio tardío en la población venezolana.
3. Se observaron asociaciones negativas (protectoras) y positivas (susceptibilidad) entre los genotipos *HP/APOE* y el desarrollo de EA.
4. La asociación del polimorfismo del gen *HP* no es independiente de la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, J.D., Calvayrac-Pawlowski, S., Cobo, S., Salvetat, N., Vicat, G., Molina, L., Touchon, J., y colaboradores. 2010. Combined measurement of PEDF, haptoglobin and tau in cerebrospinal fluid improves the diagnostic discrimination between Alzheimer's disease and other dementias. *Biomarkers*, **16(2)**: 161–171.
2. Aleshkov, S., Abraham, C.R., Zannis, V.I. 1997. Interaction of nascent ApoE2, ApoE3, and ApoE4 isoforms expressed in mammalian cells with amyloid peptide beta (1–40). Relevance to Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1997; 36:10571–10580.
3. Apostolova, L.G., Hwang, K.S., Kohanim, O., Avila, D., Elashoff, D., Jack, C.R. Jr., Shaw, L., Trojanowski, J.Q., Weiner, M.W., Thompson, P.M. 2014. ApoE4 effects on automated diagnostic classifiers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage Clin*. 2014; 4:461–472.
4. Asleh, R., Marsh, S., Shilkrut, M., Binah, O., Guetta, J., Lejbkowitz, F., Enav, B., y colaboradores. 2003. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res*. **92 (11)** (2003), 1193-1200.
5. Bowman, B.H. 1993. Haptoglobin. En Bowman BH, ed. Hepatic plasma proteins. *San Diego: Academic Press*. **1993**:159-167.
6. Bunce, M. 2000. Histocompatibility testing. Ed: Lidwell and Navarrete C. Imperial College Press London.
7. Carter, K. y Worwood, M. 2007. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int. Jnl. Lab. Hem*. **29**: 92-110.
8. Cocciolo, A., Di Domenico, F., Coccia, R., Fiorini, A., Cai, J., Pierce, W.M., Mecocci, P., y colaboradores. 2012. Decreased expression and increased oxidation of plasma haptoglobin in Alzheimer disease: Insights from redox proteomics. *Free Radic Biol Med*. Nov 15; **53(10)**:1868-76. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.596. Epub 2012 Sep 7.

9. Cole, S.L. y Vassar, R. 2007. The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, **2**:22.
10. Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C. Jr, Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., Schmechel, K.E., et al. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994; 7:180–184.
11. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993; 261:921–923.
12. Court, M.H. y Michael, H. 2012. Court's (2005–2008) online calculator. Tuft University Web site
13. Cummings, J.L. 2005. Clinical evaluation as a biomarker for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dis.* **8**: 327 – 337.
14. De Mendonça, E., Salazar, E., **Fernández-Mestre, M.** 2016. Role of genes GSTM1, GSTT1, and MnSOD in the development of late-onset Alzheimer disease and their relationship with APOE*4. *Neurologia*; 31(8):535-42.
15. Doens, D., Fernández, P.L. 2014. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neuroinflammation* 11:48-61.
16. Dorey, E., Chang, N., Yan Liu, Q., Yang, Z., Zhang, W. 2014. Apolipoprotein E, amyloid-beta, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* **30(2)**: 317–330. Disponible en web: <http://www.neurosci.cn> DOI: 10.1007/s12264-013-1422-z [Consultado en 01-10-17].
17. Emi, M., Wu, L.L., Robertson, M.A., Myers, R.L., Hegele, R.A., Williams, R.R., White, R., Lalouel, J.M. 1988. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms, *Genomics.* 1988; 3: 373-379.
18. Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., Van Duijn, C.M. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and

- Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997; 278:1349–1356).
19. Fernández, M.V. y Cruchaga, C. 2016. Genética de la enfermedad de Alzheimer: presente y futuro. *Revista Genética Médica*.
 20. Folstein, M., Folstein, S., McHugh, P. 1975. “Minimental state” A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. *J Psychiat Res* 12: 189-190.
 21. García T., Jay, D. 2004. Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer. *Gac Méd Méx* Vol. **140** No. 3.
 22. Giometto, B., Argentiero, V., Sanson, F., Ongaro, G., Tavalato, B. 1988. Acute-phase proteins in Alzheimer's disease. *Eur Neurol*. **28(1)**:30-3.
 23. Go, M., Kou, J., Lim, J-E., Yang, J., Fukuchi, K.I. 2016. Microglial response to LPS increases in wild-type mice during aging but diminishes in an Alzheimer’s mouse model: Implication of TLR4 signaling in disease progression. *Biochem Biophys Res Commun* 479(2): 331–337.
 24. Guetta, J., Strauss, M., Levy, N.S., Fahoum, L. and Levy, A.P. 2007. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* **191 (1)** (2007): 48-53.
 25. Gueye, P., Glasser, N., Ferard, G. y Lessinger, J.M. 2006. Influence of human polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44,5: 542-547.
 26. Hixson, J. & Vernier, D. 1990. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *Journal of Lipid Research* 1990; 31:545-548.
 27. Johnson, G., Brane, D., Block, W., Van Kammen, D. P., Gurklis, J., Peters, J. L., Wyatt, R. J., y colaboradores. 1992. Cerebrospinal fluid protein variations in common to Alzheimer’s disease and schizophrenia. *Appl. Theor. Electrophor*. **3**: 47–53.
 28. Kanekiyo, T., Xu, H., and Bu, G. 2014. ApoE and A β in Alzheimer’s disease: accidental encounters or partners? *Neuron*. 81(4): 740–754.

29. Kim, J., Basak, J.M., Holtzman, D.M. 2009. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009; 63:287–303.
30. Kino, K., Tsunoo, H., Higa, Y., Takami, M., Hamaguchi, H. y Nakajima, H. 1980. Hemoglobin-haptoglobin receptor in rat liver plasma membrane. *J Biol Chem*. **255**: 9616-9620.
31. Korolev, I.O. 2014. Alzheimer's disease: A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*. **4**: 024-033.
32. Langlois, M. y Delanghe, J. 1996. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clinical Chemistry*. **42, 10**: 1589-1600.
33. Liu, C.C., Kanekiyo, T., Xu, H., Bu, G. 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013; 9:106–118.
34. McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., et al. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939-944.
35. McKhann, G., Knopman, D., Chertkow, H., Hyman, B., Jack, C., Kawas, C., Klunk, W., et al. 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer disease. *Alzheimers Dement*. **7(3)**:263-9. Disponible en web: http://www.alz.org/documents_custom/Diagnostic_Recommendations_Alz_proof.pdf [Consultado en 17-09-16].
36. Melamed, M., Lache, O., Enav, B., Szafrank, T., Levy, N., Ricklis, R. y Levy A. 2001. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood*. 2001; 98,13: 3693-3698.
37. Morales, I., Farías, G. y Maccioni, R. 2010. La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*. **48 (1)**: 49-57.
38. Nielsen, M. y Moestrup, S. 2009. Receptor targeting oh hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. *Blood*. **114,4**: 764-771.

39. Olsson, M.L. 1998. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*, **38(2)**:168-73.
40. Polticelli, F., Bocedi, A., Minervini, G. y Ascenzi, P. 2008. Human haptoglobin structure and function a molecular modeling study. *FEBS Journal*. **275**: 5648-5656.
41. Quaye, I.K. 2008. Haptoglobin, inflammation and disease Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2008. 102, 735—742.
42. Raynes, J., Eagling, S. y McAdam, K. 1991. Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cells: differential regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. *Clin Exp Immunol*. **83**:488-491.
43. Ryckman, K., Williams, S. M. 2008. Calculation and Use of the Hardy-Weinberg Model in Association Studies. *Current Protocols in Human Genetics* 1.18.1-1.18.11, 2008.
44. Sadrzadeh, S.M. y Bozorgmehr, M.D. 2004. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol*. **121 (Suppl. 1)**:S97-S104.
45. Shymala, V., Ames, G. F., 1993. Genome walking by single specific primer-polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*. 217: 436 – 446.
46. Song, I.U., Kim, Y.D., Chung, S.W., Cho, H.J. 2015. Association between serum haptoglobin and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Intern Med*. **54(5)**:453-7. doi: 10.2169/internalmedicine.54.2876. Epub 2015 Jan 15.
47. Spagnuolo, M.S, Maresca, B., Mollica, M.P., Cavaliere, G., Cefaliello, C., Trinchese, G., Esposito, M.G. y colaboradores. 2014a. Haptoglobin increases with age in rat hippocampus and modulates Apolipoprotein E mediated cholesterol trafficking in neuroblastoma cell lines. *Front. Cell. Neurosci*. **08**:212. Disponible en web: <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00212> [Consultado 01-10-17].
48. Spagnuolo, M.S., Maresca, B., La Marca, V., Carrizzo, A., Veronesi, C., Cupidi, C., Piccoli, T. y colaboradores. 2014b. Haptoglobin Interacts with Apolipoprotein A and Beta-Amyloid and influences their Crosstalk. *ACS Chem. Neurosci*. **17; 5(9)**:837-47. doi: 10.1021/cn500099f.
49. Strittmatter, W. J., Roses, A. D. 1995. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **92**: 4725-4727. Disponible en web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7761390> [Consultado 19-09-16].

50. Svejgaard, A. y Ryder, L.P. 1994. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue Antigens*, 43, 18.
51. Tahara, K., Kim, H.D., Jin, J.J., Maxwell, J.A., Li, L., Fukuchi, K.I. 2006. Role of toll-like receptor signalling in A β uptake and clearance. *Brain* 129: 3006–3019.
52. Tropea, D. y Harkin, A. 2017. Editorial: Biology of Brain Disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 11:366. doi: 10.3389/fncel.2017.00366.
53. Verdier, J. 2007. Method for the differential diagnosis and the monitoring of Alzheimer-type dementia. IN INSERM (Ed.) *World Intellectual Property Organization*. WO/2007/042897. G01N 33/68 ed. France.
54. Whittington, R.A., Planel, E. and Terrando, N. 2017. Impaired Resolution of Inflammation in Alzheimer's Disease: A Review. *Front. Immunol.* 8:1464. doi: 10.3389/fimmu.2017.01464).
55. Wobeto, V.P., Zaccariotto, T.R. y Sonati, M. de F. 2008. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. *Genetics and Molecular Biology*, **31,3**: 602-620.
56. Zuwala-Jagiello J. y Osada J. 1998. Internalization study using EDTA-prepared hepatocytes for receptor mediated endocytosis of hemoglobin-haptoglobin. *Int J Biochem Cell Biol.* **30**: 923-931.