

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para la amplificación del segmento rs429358 del gen *APOE4* en Alzheimer tardío”

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Bioquímico
Farmacéutico

Autores:

Juan Diego Cárdenas Fajardo

Jorge Luis Jiménez Jiménez

Director:

Vivian Alejandra Neira Molina

ORCID:  0000-0002-1615-0746

Cuenca, Ecuador

2024-09-26

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a la memoria y la capacidad de generar nuevos recuerdos de las personas que la padecen. Se ha visto una relación entre los diferentes alelos que codifican la proteína APOE y la EA de aparición tardía. El presente trabajo busca amplificar y estandarizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) específicamente el polimorfismo rs429358 que se encuentra ubicado en el exón 4 del locus 19q13.32 (*APOE4*). La estandarización de esta prueba de PCR es crucial para los estudios genéticos y clínicos. La capacidad de detectar y analizar el polimorfismo rs429358 de manera eficiente abre nuevas vías para la investigación y potencialmente para mejorar la calidad de vida de aquellos en riesgo de desarrollar EA. **Metodología:** Se realizó el diseño de primers/cebadores con corridas de prueba in silico en donde se demostró la amplificación y especificidad, posterior a esto se enviaron a síntesis en la empresa INVITROGEN. En la estandarización de la PCR, se trató de optimizar las condiciones para asegurar la amplificación específica y reproducible del exón 4 de APOE. Esto incluye ajustar la concentración de los reactivos y primers, la temperatura de hibridación, la duración y el número de ciclos. **Resultados:** Los primers/cebadores sintetizados y comprobados in silico no fueron específicos en la amplificación in situ dado a la autocomplementariedad de los mismos.

Palabras clave del autor: mutación genética, neurodegeneración, diseño de primers



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that affects memory and the ability to generate new memories in people with AD. A relationship has been found between the different alleles encoding the APOE protein and late onset AD. The present work seeks to amplify and standardize the Polymerase Chain Reaction (PCR) specifically the rs429358 polymorphism located in exon 4 of the 19q13.32 locus (APOE4). Standardization of this PCR test is crucial for genetic and clinical studies. The ability to detect and analyze the rs429358 polymorphism efficiently opens new avenues for research and potentially for improving the quality of life of those at risk of developing AD. **Methodology:** Primers were designed with in silico test runs where amplification and specificity were demonstrated, after which they were sent to INVITROGEN for synthesis. In PCR standardization, we tried to optimize the conditions to ensure specific and reproducible amplification of APOE exon 4. This included adjusting the concentration of reagents and primers, hybridisation temperature, duration and number of cycles. **Results:** The primers synthesized and tested in silico were not specific for in situ amplification due to their self-complementarity.

Author Keywords: genetic mutation, neurodegeneration, primer design



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Capítulo I.....	15
1. Introducción.....	15
1.1 Antecedentes.....	15
1.2 Planteamiento del problema.....	16
1.3 Justificación.....	17
1.4 Objetivos.....	18
1.4.1 Objetivos generales.....	18
1.4.2 Objetivos específicos.....	18
Capítulo II.....	18
2. Marco teórico.....	18
2.1 Fisiopatología.....	18
2.2 Epidemiología.....	19
2.3 Herencia genética.....	19
2.4 Métodos de diagnóstico.....	20
2.4.1 Estudios de imagen.....	20
Resonancia Magnética.....	20
Tomografía por emisión de positrones (PET) de fluorodesoxiglucosa (FDG).....	21
2.4.2 Estudios genéticos.....	22
2.4.3 Estudio de líquido cefalorraquídeo.....	23
2.4.4 Análisis de sangre.....	25
Niveles de A β	26
Proteína Tau.....	27
Proteína NFL.....	27
2.5 Prevención.....	27
2.6 Tratamiento.....	28
2.7 Mutaciones.....	28
2.8 Mutaciones APOE4 - Polimorfismo rs429358.....	29
2.9 Reacción en cadena de la polimerasa.....	31
2.9.1 Fundamento.....	31
2.9.2 Componentes.....	32
2.9.3 Etapas.....	35
Desnaturalización.....	35
Hibridación.....	35
Elongación.....	35

Capítulo III.....	38
3. Metodología.....	38
3.1 Diseño y tipo de estudio.....	38
3.2 Diseño de los primers/cebadores.....	38
3.3 Verificación de la especificidad in SILICO.....	40
3.4 Cuantificación de la cantidad de ADN.....	40
3.5 Estandarización de PCR.....	41
3.5.1 Reconstitución de Primers.....	41
3.5.2 Protocolo 1.....	42
3.5.3 Protocolo 2.....	42
3.5.4 Protocolo 3.....	42
3.5.5 Protocolo 4.....	43
3.5.6 Protocolo 5.....	43
3.5.7 Temperaturas y tiempos óptimos para la PCR.....	44
Capítulo IV.....	47
4. Resultados y discusión.....	47
4.1 Resultados.....	47
4.1.1 PCR in silico.....	47
4.1.2 Cuantificación del ADN.....	48
4.1.3 PCR in situ.....	48
Capítulo V.....	59
5. Conclusiones y recomendaciones.....	59
5.1 Conclusiones.....	59
5.2 Recomendaciones.....	60
Referencias.....	61
Anexos.....	72
Anexo A: Diseño de los primers.....	72
Anexo B: Verificación de la especificidad de los primers diseñados in sílico.....	77
ANEXO C. Protocolo para preparación del gel de agarosa, las muestras amplificadas y corrida de la electroforesis.....	79

Índice de figuras

Figura 1. Resonancia magnética estructural.....	20
Figura 2. Imagen de PET de FDG.....	21
Figura 3. Imagen de PET A β correlacionada con neuropatología.....	22
Figura 4. Modelo de los alelos T y C de rs429358.....	31
Figura 5. Proceso de la PCR.....	32
Figura 6. Cebadores y ADN molde.....	33
Figura 7. ADN molde y dirección de cebadores.....	34
Figura 8. Fases de la PCR.....	36
Figura 9. Representación esquemática de los productos de amplificación de PCR.....	37
Figura 10. Secuencia de 860 Nucleótidos ubicada en la región 19q13.32 del ADN que codifica parte de la proteína APOE.....	38
Figura 11. Posición en el Genoma del polimorfismo rs429358.....	39
Figura 12. Posición en el genoma del polimorfismo rs7412.....	39
Figura 13. Marcador de peso molecular de 100pb.....	46
Figura 14. Gel de electroforesis en el primer protocolo.....	49
Figura 15. Gel de electroforesis en el segundo protocolo.....	49
Figura 16. Gel de electroforesis en el tercer protocolo.....	50
Figura 17. Gel de electroforesis en el cuarto protocolo.....	51
Figura 18. Gel de electroforesis en el quinteto protocolo.....	52

Índice de tablas

Tabla 1. Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer en LCR.....	24
Tabla 2. Genotipos resultantes del gen APOE.....	30
Tabla 3. Primers/cebadores diseñados para el fragmento rs429358.....	40
Tabla 4. Reconstitución de los primers.....	41
Tabla 5. Condiciones para el protocolo 1.....	42
Tabla 6. Condiciones para el protocolo 2.....	42
Tabla 7. Condiciones para el protocolo 3.....	43
Tabla 8. Condiciones para el protocolo 4.....	43
Tabla 9. Condiciones para el protocolo 5.....	44
Tabla 10. Temperaturas y tiempos para la marcha experimental de los distintos protocolos.....	44
Tabla 11. PCR in silico.....	47
Tabla 12. Muestras de ADN cuantificado.....	48
Tabla 13. Secuencia de los cebadores utilizados en estudio publicado por (Najd et al., 2023).....	55
Tabla 14. Secuencia de los cebadores utilizados en estudio publicado por (Pourshaikhali, et al., 2022).....	58

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

APOE: Apolipoproteína E.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EOAD: Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano.

LOAD: Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RM: Resonancia magnética.

PET de FDG: Tomografía por emisión de positrones (PET) de fluorodesoxiglucosa.

DCL: Deterioro cognitivo leve.

SNP: Polimorfismo de un solo Nucleótido.

Glosario de términos

ADN: ADN es el nombre químico de la molécula que contiene la información genética en todos los seres vivos. La molécula de ADN consiste en dos cadenas que se enrollan entre ellas para formar una estructura de doble hélice. Cada cadena tiene una parte central formada por azúcares (desoxirribosa) y grupos fosfato. Enganchado a cada azúcar hay una de las siguientes 4 bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G), y timina (T). Las dos cadenas se mantienen unidas por enlaces entre las bases; la adenina se enlaza con la timina, y la citosina con la guanina. La secuencia de estas bases a lo largo de la cadena es lo que codifica las instrucciones para formar proteínas y moléculas de ARN.

ADN Polimerasa: El ADN Polimerasa es una enzima de suma importancia en el proceso de replicación de ADN. Es la encargada de agregar los nucleótidos correspondientes para crear una nueva hebra de ADN a partir de una preexistente. Los nucleótidos agregados suelen ser referidos como desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP). Al agregar nucleótidos se forman enlaces fosfodiéster y, las bases nitrogenadas se unen por puentes de hidrógeno. La enzima sintetiza en un sentido 5'-3'

ADN Polimerasa HiFi: El ADN polimerasa G-HiFi es una nueva ADN polimerasa recombinante modificada genéticamente adecuada para secuencias ricas en GC que son difíciles de amplificar.

Alelo: Un alelo es cada una de las dos o más versiones de un gen. Un individuo hereda dos alelos para cada gen, uno del padre y el otro de la madre. Los alelos se encuentran en la misma posición dentro de los cromosomas homólogos. Si los dos alelos son idénticos, el individuo es homocigoto para este gen. En cambio, si los alelos son diferentes, el individuo es heterocigoto para este gen.

APOE: La apolipoproteína E, es una molécula de la familia de apolipoproteínas y la principal apolipoproteína de los quilomicrones. Tiene afinidad por un receptor específico que se encuentra en los hepatocitos y otras células del organismo.

Autosómico Dominante: La dominancia autosómica es un patrón de herencia característico de algunas enfermedades congénitas. 'Autosómico' significa que el gen en cuestión está localizado en uno de los cromosomas no sexuales (es decir, del cromosoma número 1 al 22). 'Dominante' significa que una sola copia de la mutación relacionada con una enfermedad ya es suficiente para causar dicha enfermedad.

Autosómico Recesivo: carácter recesivo (en vez de dominante), donde se necesita que ambas copias del gen en cuestión estén alteradas, o mutadas, para que se produzca la enfermedad. La enfermedad de Huntington es un ejemplo de un trastorno genético autosómico dominante.

Cromosoma: Un cromosoma es un paquete ordenado de ADN que se encuentra en el núcleo de la célula. Los diferentes organismos tienen diferentes números de cromosomas. Los humanos tenemos 23 pares de cromosomas - 22 pares autosómicos, y un par de cromosomas sexuales, X e Y. Cada progenitor contribuye con un cromosoma de su par de autosomas y uno del par sexual, de manera que la descendencia obtenga la mitad de sus cromosomas de su madre y la mitad de su padre.

Electroforesis: La electroforesis es una técnica utilizada para separar el ADN, el ARN, o moléculas o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica. Se utiliza una corriente eléctrica para mover las moléculas y que se separen a través de un gel. Los poros del gel actúan como un colador, permitiendo que las moléculas más pequeñas se mueven más rápido que las grandes. Las condiciones utilizadas durante la electroforesis se pueden ajustar para separar moléculas en el rango de tamaño que se desee.

Exón: Región del ADN que se mantiene en el ARN mensajero (ARNm) maduro. En los genes que codifican proteínas, son los exones los que contienen la información para producir la proteína codificada por el gen.

Gen: Secuencia de ADN que constituye la unidad funcional para la transmisión de los caracteres hereditarios.

Heterocigoto: Heterocigoto se refiere a haber heredado dos formas diferentes de un gen en particular, una de cada progenitor. Lo contrario es un genotipo homocigoto, donde un individuo hereda formas idénticas de un gen en concreto del padre y de la madre.

Hibridación: La hibridación es un proceso por el cual se combinan dos cadenas complementarias simples de ácidos nucleicos (ADN o ARN) y se permite que formen una única molécula de doble cadena por apareamiento de sus bases. Y el proceso inverso, una doble cadena de moléculas de ADN (o ARN o ADN/ARN) puede ser calentada para romper el apareamiento de las bases y separar las dos hebras. La hibridación es parte de muchas técnicas importantes en el laboratorio como la reacción en cadena de la polimerasa y la hibridación de Southern.

Homocigoto: Organismo que tiene 2 alelos iguales o idénticos en un locus particular en un genoma diploide.

Intrón: Región del ADN que forma parte de la transcripción primaria de ARN, pero a diferencia de los exones, son eliminados del ARNm maduro, previamente a su traducción.

Locus: Un locus es el lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN, así como su dirección genética. El plural de locus es "loci".

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN específico partiendo de una mínima cantidad de material de partida.

Polimorfismo: El polimorfismo, en lo que se refiere a la genómica, es la presencia de dos o más formas variantes de una secuencia específica de ADN que puede producirse entre diferentes personas o poblaciones. El tipo más frecuente de polimorfismo implica la variación en un nucleótido único (también denominado polimorfismos de nucleótido único, o SNP). Otros polimorfismos pueden ser mucho más grandes y abarcar segmentos más largos de ADN.

Polimorfismo de un Solo Nucleótido (SNP): Tipo de polimorfismo que produce una variación en un solo par de bases. Se refiere a los lugares en el genoma donde las personas son diferentes en un lugar específico. Aproximadamente en una de cada 1.000 letras del código se encuentra uno de estos lugares.

Dedicatorias

A mis queridos padres, Nieves y Juan, por su inquebrantable amor y sacrificio. Gracias por su apoyo incondicional y por hacer lo imposible para que pudiera alcanzar este sueño. Su esfuerzo y dedicación son el verdadero motor de este logro.

A mis hermanos, Carlos, Betty y Fernando, por ser mi inspiración y mi fortaleza. Su compañía y ánimo han sido esenciales en este camino.

A mis padrinos Felipe Segundo Pomavilla y Maria Victoria Pichazaca, por su constante apoyo y cariño.

A mi abuelito Espiritu, quien luchó contra el Alzheimer. Esta tesis es un homenaje a su memoria.

A mis amigas Diana, Paola y Samantha por estar en todo momento, gracias por ser mis compañeras en este viaje.

A mis amigos Diego, Pedro y Sebastian por su incondicional apoyo en todo momento.

A todas las personas que han estado a mi lado y se han quedado, así como a aquellas que se han ido pero que también contribuyeron a mi formación. Su apoyo y enseñanzas han dejado una huella imborrable en mi vida (5'-3').

Este logro es tanto suyo como mío. Con todo mi cariño y gratitud.

Juan Diego Cárdenas.

Dedicatorias

A mis padres Leonardo e Isabel, que han sido mi fuente de inspiración para cada día ser una mejor persona y luchar por mis objetivos. Gracias por su amor incondicional, su paciencia y su constante apoyo en cada paso de este camino. Sin ustedes, este logro no habría sido posible.

A mis hermanos Jessenia, Carmen, Verónica y Vinicio, que con sus consejos y apoyo me han brindado la fortaleza necesaria para superar los desafíos. Su confianza en mí ha sido fundamental para alcanzar esta meta. Gracias por estar siempre ahí, por sus palabras de aliento y por creer en mis sueños.

A mis amigos y compañeros, que han compartido conmigo esta travesía académica. Gracias por los momentos de estudio, las risas y el compañerismo. Su presencia ha hecho que este camino sea más llevadero y enriquecedor.

A mis profesores y mentores, que con su conocimiento y guía han sido pilares esenciales en mi formación.

Agradezco sinceramente su apoyo y dedicación, ya que cada uno de ustedes ha sido fundamental para alcanzar este logro.

Jorge Luis Jiménez

Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Dra. Alejandra Neira y a la Bqf. Emilia Castillo por su invaluable guía y apoyo a lo largo del desarrollo del trabajo de integración curricular. Sus enseñanzas y dedicación han sido fundamentales para mi crecimiento profesional y personal..

Así mismo un agradecimiento especial a la Dra. Angelica Ochoa y a la Dra. Zulma Zamora, cuyo compromiso y entusiasmo me han inspirado a lo largo de este camino. Su apoyo y orientación han sido determinantes para la culminación de la carrera.

A todos ustedes, gracias por creer en mí y por su incansable esfuerzo en ayudarme a alcanzar este objetivo.

Juan Diego Cárdenas

La culminación de esta tesis no habría sido posible sin el apoyo, la guía y la colaboración de personas e instituciones, a quienes me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, quiero expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Alejandra Neira. Su paciencia, dedicación y guía constante a lo largo de este proceso han sido fundamentales para la realización de esta tesis. Sus valiosos comentarios y sugerencias han ayudado a mejorar y perfeccionar cada parte de la misma. Su compromiso y profesionalismo ha sido una fuente de inspiración y motivación.

A la Bqf. Emilia Castillo, quiero agradecerle por su incondicional apoyo en la realización de este trabajo. Su experiencia y conocimiento fueron cruciales en los momentos más desafiantes de esta investigación. Gracias por su tiempo, esfuerzo y por compartir conmigo su experiencia, lo cual ha enriquecido significativamente este proyecto.

También quiero extender mi agradecimiento al Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca y a la Universidad en general. A estas instituciones expreso mi gratitud por ofrecer sus infraestructuras y equipos para llevar a cabo la parte práctica de este trabajo de titulación. Sin su apoyo y los recursos proporcionados, esta investigación no habría sido posible.

Jorge Luis Jiménez

Capítulo I

1. Introducción

1.1 Antecedentes

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la formación de placas extracelulares de β -amiloide y ovillos neurofibrilares intracelulares de Tau (Knopman et al., 2021). Suele manifestarse principalmente con un deterioro cognitivo de tipo amnésico, aunque en algunos casos menos comunes puede presentarse con un deterioro cognitivo no amnésico (Caffò et al., 2022). La dificultad más común en los pacientes es la pérdida de memoria a corto plazo, pero también pueden experimentar problemas en el habla expresiva, el procesamiento visuoespacial y las funciones ejecutivas (Foxe et al., 2020). La mayoría de los casos no se heredan de forma dominante, y la genética juega un papel complejo e importante en la aparición de la enfermedad en muchas personas (Andrade-Guerrero et al., 2023).

La etiología de la EA es muy compleja dado que tiene relación con factores genéticos, epigenéticos y ambientales, la aparición de la EA puede ser temprana o tardía. Según Blumenfeld et al. (2024), la EA de inicio temprano constituye al menos un 1% de los casos reportados a diferencia de EA de inicio tardío que representa alrededor de 90% de los casos y guarda relación con alteraciones genéticas en el locus de la apolipoproteína E (APOE)., los alelos de este gen derivan en isoformas que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad, siendo la isoforma APOE4 la más significativa, su presencia deriva en la producción de citoquinas proinflamatorias, como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), que representa una de las citoquinas proinflamatorias clave y desencadena la producción de IL-1, IL-6 e IL-8, promoviendo la inflamación crónica, a menos que sea contrarrestada por citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (Plantone D. et al., 2023). Esta situación lleva a la gliosis y formación de placas amiloides, lo que a su vez contribuye a la neurodegeneración (Blumenfeld et al., 2024).

La apolipoproteína E es una glicoproteína producida en el hígado y los astrocitos, y se encarga de regular los lípidos en el cuerpo (Lumsden, et al., 2020). Esta proteína, que consta de 299 aminoácidos, se encuentra en el locus 19q13.2. El gen que la codifica tiene 4 exones y 3 intrones, con una longitud total de 3597 nucleótidos (Martínez, et al., 2020). Se sabe que esta proteína es polimórfica y presenta tres alelos diferentes: ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4, cuyas combinaciones generan seis

genotipos distintos (3 homocigotos y 3 heterocigotos) (Mateo et al., 2023). El alelo $\epsilon 4$ está asociado con un mayor riesgo de sufrir ciertos trastornos mentales, neurológicos y cerebrovasculares, destacando una relación particularmente fuerte con la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Mateo et al., 2023). El alelo de la ApoE tipo 4 (E4) se ha visto como un factor de riesgo para la EA, con un riesgo atribuible estimado de 45 a 60% (Robledo et al., 2011).

1.2 Planteamiento del problema

La demencia es una de las principales enfermedades que causan discapacidad y dependencia en adultos mayores a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 55 millones de personas viven con esta enfermedad, y se calcula que para el 2050 se registren 139 millones de casos, afectando principalmente a ciudadanos mayores a 65 años de países en vías de desarrollo pudiendo llegar a afectar a población joven. La demencia puede estar causada por patologías que afectan al cerebro como la apoplejía, lesiones cerebrales, alzheimer siendo esta última la más común representando entre el 60 - 70 % de casos registrados, siendo las personas de sexo femenino las mas afectadas (OMS, 2023).

Según la Organización Panamericana de Salud (OPS) en América se estima que 10 millones de personas viven con demencia, siendo la población de América Latina y el Caribe la más afectada pudiendo llegar a duplicar la cifras actuales hasta el 2030, el aumento de casos y la deficiente atención por casas de salud especializadas ha elevado la morbimortalidad colocándose como la tercera causa de muerte más frecuente en el continente Americano (OPS, 2023). En Ecuador las cifras no son prometedoras, según la Junta de Beneficencia de Guayaquil (2020), 120 mil personas han sido diagnosticadas con Alzheimer. Así mismo estudios publicados por (Mejia et al., 2021) reporta que en la ciudad de Cuenca 24 de cada 1000 pacientes mayores a 65 años atendidos son diagnosticados con demencia con predominio en población femenina con incidencia de casos de hasta un 57,14%.

La enfermedad de alzheimer es la causa mas prevalente de demencia senil, los factores involucrados en la aparición de la enfermedad son los genéticos y ambientales. Entre los factores genéticos emergentes de la EA está la mutación genética del gen que codifica la Apolipoproteína E (APOE) ubicado en el cromosoma 19 el cual presenta 3 polimorfismos, *APOE2*, *APOE3*, *APOE4*, siendo la

de mayor importancia el polimorfismo *APOE4* dado a que se relaciona con efectos tóxicos a nivel cerebral que predispone a la persona portadora de la mutación a desarrollar EA (Safieh et al., 2019).

El riesgo de desarrollar la EA aumenta con cada copia de la variante *APOE4* en comparación con el genotipo *APOE3/APOE3*: el odds ratio (OR) es 2,6 (*APOE2/APOE4*) y 3,2 (*APOE3/APOE4*) con una copia del alelo *APOE4*, y el OR aumenta a 14,9 con dos copias del alelo (*APOE4/APOE4*). Por otro lado, el alelo *APOE2* de *APOE* protege contra la Enfermedad de Alzheimer, con un OR = 0,6 para individuos *APOE2/APOE2*. *APOE4* se asocia con una edad de inicio más temprana, siendo 68 años la edad media de inicio clínico para los homocigotos *APOE4* frente a 84 años de edad media de inicio clínico para los sujetos que no portan el alelo *APOE4* (Urfer & Urfer, 2017). Aunque la EA actualmente es incurable, las intervenciones tempranas y el tratamiento oportuno podrían ayudar a los pacientes a retrasar la progresión de la enfermedad aumentando la calidad de vida, existen evidencias que son efectivas para mejorar la función cognitiva, tratar la depresión, mejorar el estado de ánimo del cuidador y retrasar la institucionalización. Algunas de estas intervenciones sólo funcionan, o funcionan mejor, cuando se inician en una etapa más temprana del curso de la enfermedad (Chau et al., 2022).

1.3 Justificación

La incidencia de la EA aumenta con el paso de los años debido al envejecimiento de la población, las condiciones de vida de la misma y los hábitos poco saludables. Entre los factores de riesgo genético asociados a la EA de aparición tardía, está la variante *APOE4* que predispone significativamente a la aparición de la enfermedad de inicio tardío. El propósito fundamental de este estudio radica en la estandarización de la metodología de la PCR para la amplificación del segmento que codifica la *APOE4*, específicamente focalizado en el fragmento rs429358 del exón 4. Aunque este polimorfismo genético no constituye un diagnóstico definitivo de la EA, su presencia incrementa considerablemente la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Por ende, la detección temprana de esta mutación mediante la metodología estandarizada permitirá a los pacientes conocer el riesgo de susceptibilidad, siendo importante para incluir cambios en el estilo de vida de los mismos. Además, la identificación temprana de esta variante genética posibilitará la implementación de tratamientos precoces que podrían contribuir a mitigar los riesgos asociados y retrasar el progreso de la enfermedad. En consecuencia, este enfoque no solo ofrece un potencial beneficio para el paciente en términos de prevención y manejo, sino que también abre la puerta a

intervenciones terapéuticas más efectivas y personalizadas en el contexto de la EA de aparición tardía.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivos generales

- Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del segmento rs429358 del gen APOE4, involucrado en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

1.4.2 Objetivos específicos

- Identificar la secuencia del segmento rs429358 del polimorfismos APOE4, asociado a la patología de estudio.
- Diseñar y sintetizar cebadores específicos para la amplificación del segmento rs429358.
- Evaluar los resultados obtenidos por electroforesis en gel de agarosa.

Capítulo II

2. Marco teórico

2.1 Fisiopatología

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por la disfunción sináptica que afecta tanto a nivel molecular como celular, así como a los circuitos corticales más amplios, especialmente en la corteza cognitiva, este enfoque unificador de la fisiopatología sináptica integra observaciones sobre genética, biología celular, neuropatología y manifestaciones clínicas (Golde et al., 2018).

La patología se manifiesta en lesiones visibles, como ovillos neurofibrilares con Tau, placas con β -amiloide, glía activada y endosomas agrandados, que se pueden observar mediante microscopía (Zlokovic et al., 2020). También incluye fenómenos invisibles, como la pérdida de homeostasis sináptica, la muerte neuronal y la degradación de la integridad de la red neuronal, aunque se ha destacado la importancia de las proteínas precursora de amiloide y Tau, la hipótesis de la cascada amiloide no considera muchos otros mecanismos ocultos que podrían ser relevantes (Golde et al., 2018).

2.2 Epidemiología

Se proyecta que a mediados de este siglo habrá 152 millones de personas con demencia a nivel global, con el incremento más significativo en países de ingresos bajos y medios (Patterson, 2018). En América, según las cifras de 2020 sobre la enfermedad de Alzheimer, se prevé que el número de pacientes mayores de 65 años aumente drásticamente de 5.8 millones a 13.8 millones para 2050. Estudios en Japón y China han revelado un aumento significativo en la prevalencia en las últimas décadas (Ohara et al., 2017).

De acuerdo con Zhang et al. (2021), la prevalencia específica por edad en mujeres es 1,17 veces mayor que en hombres, y la tasa de mortalidad ajustada por edad también es más alta en mujeres, lo que indica que factores distintos a la mayor esperanza de vida contribuyen al predominio femenino. Además, entre 2000 y 2018, las muertes por Alzheimer aumentaron un 146,2%, convirtiéndose en la quinta causa principal de muerte entre las personas mayores en Estados Unidos.

En estudios publicados por Paschalidis et al. (2023), entre el 2000 - 2019 en Brasil se reportaron alrededor de 211 658 muertes por demencia, con aumento en los últimos años. Por otro lado Zurique et al, (2019), se estima que en latinoamérica la prevalencia de pacientes diagnosticados con demencia es de un 11 % comparado con otras partes del mundo esta cifra es mayor.

2.3 Herencia genética

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una fuerte predisposición genética que se manifiesta en dos tipos principales según la edad de inicio. La enfermedad de Alzheimer de inicio temprano (EOAD) se hereda de padres a hijos con un 50% de probabilidades y suele manifestarse antes de los 65 años, con una progresión rápida y está vinculada a mutaciones en los genes APP, PSEN1 y PSEN2 (Liang et al., 2023).

Por otro lado, la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (LOAD) tiene una herencia más compleja, no puramente dominante, y está influenciada por múltiples genes y factores ambientales. Aparece a partir de los 65 años, generalmente progresa más lentamente que la EOAD y está principalmente asociada con la variante APOE ε4 del gen APOE, aunque otras mutaciones también pueden estar involucradas (Yang et al., 2021).

2.4 Métodos de diagnóstico

2.4.1 Estudios de imagen

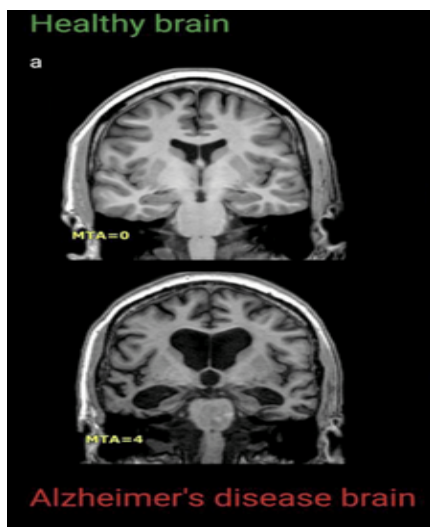
Resonancia Magnética

La resonancia magnética (RM) volumétrica del hipocampo es un método esencial para evaluar la enfermedad de Alzheimer, ya que permite medir la atrofia hipocampal, indicativa del daño neuronal característico de la enfermedad. Los escaneos de RM proporcionan una poderosa herramienta para evaluar el volumen hipocampal, con mediciones que se correlacionan estrechamente con los números neuronales, validando así su utilidad anatómica. Además, las reducciones en el volumen del hipocampo detectadas por RM sirven como indicadores tempranos de la patología de la EA, facilitando la detección precoz y el seguimiento de la enfermedad (van Oostveen & de Lange, 2021).

En la figura 1, se puede observar la diferencia entre una RM para un cerebro sano y uno con la enfermedad.

Figura 1.

Resonancia magnética estructural.



Fuente: (van Oostveen & de Lange, 2021).

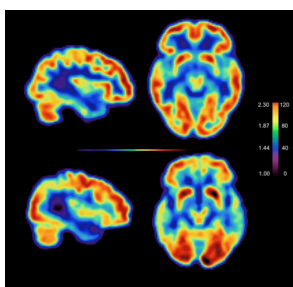
Tomografía por emisión de positrones (PET) de fluorodesoxiglucosa (FDG)

El PET de FDG, que mide las tasas metabólicas cerebrales de la glucosa, se ha establecido como un biomarcador relevante y altamente específico para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. Los estudios han demostrado que es capaz de detectar sujetos con una alta sensibilidad y especificidad, incluso en etapas tempranas de la enfermedad. Además, se ha encontrado que es superior a la resonancia magnética estructural en el diagnóstico, ya que los cambios anormales en el metabolismo cerebral preceden a los cambios detectables en la estructura cerebral (Henriques et al., 2018).

En la figura 2 se puede apreciar que el PET de FDG evalúa la captación de un compuesto similar a la glucosa marcado con radioisótopos, el cual se relaciona con el metabolismo cerebral y la actividad de las sinapsis.

Figura 2.

Imagen de PET de FDG.



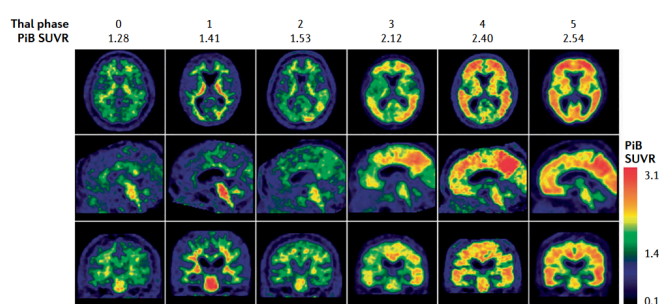
Fuente: (van Oostveen & de Lange, 2021).

Los biomarcadores de imagen, como la tomografía computarizada (TC), el PET de fluorodesoxiglucosa (FDG) y la resonancia magnética (RM), inicialmente empleados en la evaluación del deterioro cognitivo, presentan limitaciones de especificidad y sensibilidad para la enfermedad de Alzheimer, lo que dificulta su integración en el modelo conceptual de la enfermedad. La introducción del PET de amiloide beta ($A\beta$) en 2004 permitió clarificar el papel del PET de FDG y la RM como marcadores de neurodegeneración, relegando la TC en investigaciones posteriores. Los criterios diagnósticos de la Asociación de Alzheimer del Instituto Nacional del Envejecimiento en 2011 establecieron un modelo de diagnóstico basado en biomarcadores de amiloide y neurodegeneración para caracterizar la relación con la enfermedad en diferentes etapas del deterioro cognitivo (Knopman et al., 2016).

La Figura 3 muestra que las imágenes de PET de A β concuerdan estrechamente con la neuropatología. Los escaneos de PiB (Pittsburgh Compound B) muestran diferentes niveles de captación en una región global de interés, reflejando la carga de A β post-mortem evaluada según la "fase de Thal", que clasifica la acumulación de A β en cinco niveles. La señal relevante de PiB se encuentra en la superficie cortical, mientras que la unión en la materia blanca subcortical y el tronco cerebral representa la unión no específica del marcador (Knopman et al., 2021).

Figura 3.

Imagen de PET A β correlacionada con neuropatología



Fuente: (Knopman et al., 2021).

2.4.2 Estudios genéticos

Los estudios genéticos son una herramienta valiosa para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. Identificar loci genéticos asociados con biomarcadores específicos puede proporcionar una comprensión más profunda de los componentes fisiopatológicos (Stevenson-Hoare et al., 2023). Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado loci en genes como GEMC1 y OSTN, además de los más comúnmente reportados en el clúster TREM, APOE, APOC y TOMM40 (Cruchaga et al., 2013).

No obstante, estos estudios suelen centrarse en un número limitado de biomarcadores, principalmente P-Tau181 y A β 42. Por ejemplo, los GWAS de niveles plasmáticos de P-Tau181 y NfL han identificado loci principalmente en la región genómica de APOE, únicamente para P-Tau181. La investigación de la relación entre la puntuación de riesgo poligénico (PRS) para Alzheimer y los niveles plasmáticos de P-Tau181 ha mostrado asociaciones significativas con PRS que incluyen la región de APOE, y asociaciones moderadas cuando se excluye APOE (Lord et al., 2021).

Además, estudios de GWAS sobre la relación de los niveles plasmáticos de A β 40 y A β 42 en participantes no dementes han identificado variantes significativas en los genes APOE, BACE1, APP, PSEN2, CCK y ZNF397. Estas investigaciones subrayan la relevancia de los estudios genéticos en la identificación y comprensión de los biomarcadores (J.-Q. Li et al., 2018).

2.4.3 Estudio de líquido cefalorraquídeo

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es esencial en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, debido a su contacto directo con el cerebro, lo que permite reflejar fielmente los procesos metabólicos cerebrales, tienen una correlación más alta con los resultados de la PET realizada con el compuesto B de Pittsburgh marcado con ^{11}C , lo que les otorga un mayor valor predictivo y precisión diagnóstica, especialmente en fases prodrómicas o presentaciones atípicas de la enfermedad. Actualmente, los biomarcadores principales en el LCR utilizados para diagnosticar la enfermedad son A β 42, t-Tau y p-Tau (Janeiro et al., 2021).

Los péptidos A β como A β 42, A β 40, A β 37, A β 38, sAPP α , y sAPP β fueron los primeros biomarcadores moleculares identificados. En particular, A β 42 se asocia con la enfermedad de Alzheimer, debido a sus niveles reducidos en el LCR de los pacientes afectados, mientras que A β 40 también muestra una relación, aunque con menor impacto diagnóstico. A β 37 y A β 38 podrían diferenciar la enfermedad de otras demencias, pero no son suficientemente fiables para el diagnóstico clínico (Robinson et al., 2017).

Los productos de la escisión de la proteína precursora amiloide, sAPP α y sAPP β , no son útiles por sí solos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer debido a la falta de diferencias significativas entre pacientes y controles. No obstante, combinados con otros biomarcadores, pueden mejorar la precisión diagnóstica (Magdalinou et al., 2015). Los biomarcadores t-Tau y p-Tau en el LCR están sobreexpresados en Alzheimer, con t-Tau asociado a la pérdida neuronal y p-Tau a la formación de ovillos corticales, siendo este último específico de la enfermedad (Robinson et al., 2017).

La determinación conjunta de A β 42, t-Tau y p-Tau mejora la especificidad y sensibilidad diagnóstica en comparación con su evaluación individual. Estos marcadores también pueden predecir la progresión del déficit cognitivo leve a Alzheimer, aunque la falta de valores de referencia estandarizados entre laboratorios es un desafío (Olsson et al., 2016).

Estudios recientes han identificado nuevos biomarcadores, como la cadena ligera de neurofilamentos (NFL), que se libera al LCR y al torrente sanguíneo durante la degeneración axonal. Niveles elevados de NFL indican daño axonal y desmielinización, mostrando una relación significativa con la gravedad del Alzheimer y ayudando a diferenciar esta enfermedad de otras demencias, como la demencia con cuerpos de Lewy (Janeiro et al., 2021). YKL-40, relacionado con la activación glial y astrocítica, junto con proteínas como carnosinasa I, cromogranina A y NCAM, podría ser útil para el diagnóstico precoz del Alzheimer, aunque con efecto moderado (Robinson et al., 2017).

Biomarcadores prometedores como la neurogranina y el TREM-2 han mostrado resultados alentadores en el diagnóstico del Alzheimer. Varios estudios recientes han demostrado que los pacientes con Alzheimer presentan niveles elevados de neurogranina, una proteína postsináptica específica en regiones afectadas por la EA, lo que indica degeneración sináptica (Wellington et al., 2016). Además, el TREM-2, un receptor inmune en la microglía, también está elevado en la EA y se relaciona con niveles altos de Tau y p-Tau en el LCR, sugiriendo su utilidad en la detección temprana de la enfermedad antes de la aparición de la demencia (Suárez-Calvet et al., 2016).

En la tabla 1, se observan los biomarcadores t-Tau, p-Tau y A β 42 en el LCR, con una precisión del 85-90%, son los más consistentes y deben usarse en la práctica clínica y la investigación. Además, la NFL y la neurogranina en el LCR han mostrado ser prometedores, aunque se necesitan más estudios para confirmar su precisión y utilidad.

Tabla 1.

Biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer en LCR.

Biomarcadores	Descripción	LCR
A β 42	Marcador del metabolismo del APP	↓ niveles en pacientes con Alzheimer. Gran tamaño del efecto
A β 40	Marcador del metabolismo del APP	↓ niveles en pacientes con Alzheimer. Pequeño tamaño del efecto
A β 38	Marcador del metabolismo del APP	No hay diferencias entre grupos
sAPP α	Producto de escisión de la APP	No hay diferencias entre grupos
sAPP β	Producto de escisión de la APP	No hay diferencias entre grupos

t-Tau y p-Tau (Thr 181)	Marcadores relacionados con problemas de memoria	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Gran tamaño del efecto
NFL	Marcador relacionado con la neurodegeneración	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Gran tamaño del efecto
NSE	Marcador relacionado con la neurodegeneración	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Tamaño del efecto moderado
VLP-1	Marcador relacionado con la neurodegeneración	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Tamaño del efecto moderado
HFABP	Marcador relacionado con la neurodegeneración	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Tamaño del efecto moderado
Ratio de albúmina	Marcador de la función de la barrera hematoencefálica	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Pequeño tamaño del efecto
YKL-40	Marcador de la activación de las células gliales	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Tamaño del efecto moderado
MCP-1	Marcador de la activación de las células gliales	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Pequeño tamaño del efecto
GFAP	Marcador de la activación de las células gliales	No hay diferencias entre grupos
Neurogranina	Marcador de la degeneración sináptica	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Gran tamaño del efecto
sTREM2	Marcador relacionado con la neurodegeneración	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Tamaño del efecto moderado
α-sinucleína	Proteína neuronal presináptica	↑ niveles en pacientes con Alzheimer. Tamaño de efecto mínimo.

Fuente: (Janeiro et al., 2021).

2.4.4 Análisis de sangre

El diagnóstico mediante biomarcadores en sangre es menos invasivo que la punción lumbar, pero presenta desafíos debido a la baja y heterogénea presencia de proteínas cerebrales en el plasma. Estas proteínas pueden ser degradadas o eliminadas antes de su detección, lo que complica su identificación. A pesar de algunos estudios sobre Aβ y Tau plasmáticos, la precisión de los

biomarcadores sanguíneos para reflejar los cambios cerebrales aún no está bien establecida (Blennow & Zetterberg, 2015).

Niveles de A β

La variabilidad en los niveles de A β 42 y A β 40 en plasma entre pacientes con Alzheimer y controles sanos dificulta su uso como biomarcadores. Aunque se ha sugerido que niveles elevados de A β 42 pueden aumentar el riesgo de Alzheimer, otros estudios indican que una baja proporción de A β 42/A β 40 está asociada con un mayor riesgo de deterioro cognitivo leve y Alzheimer. Sin embargo, estos biomarcadores carecen de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico precoz (Nabers et al., 2018).

No hay una correlación evidente entre los niveles de A β en el LCR y en plasma, lo que sugiere que los niveles plasmáticos de A β podrían reflejar la producción periférica en lugar de la patología cerebral. Estos niveles son variables entre individuos y pueden ser influenciados por factores externos como medicamentos y la presencia de A β en las plaquetas. Además, la unión a otras proteínas y la captura en plaquetas pueden afectar los niveles plasmáticos de A β (Janeiro et al., 2021).

Los métodos de detección como ELISA pueden tener limitaciones debido a la interacción de los péptidos de A β con varias proteínas en el plasma, lo que podría dificultar su reconocimiento en los inmunoensayos. Esto podría llevar a una falta de precisión en la medición de los niveles de A β en los pacientes (Pérez-Grijalba et al., 2016). Para abordar este problema, en 2011, el equipo de Zetterberg desarrolló un nuevo método basado en la técnica de Simoa, que utiliza matrices para detectar moléculas individuales. Este método permite una cuantificación precisa de los niveles de A β 42 en el plasma con alta sensibilidad, reduciendo las interferencias de la matriz (Janeiro et al., 2021).

Se ha demostrado que los pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) o enfermedad de Alzheimer tienen proporciones más bajas de A β 42 en comparación con sujetos control. Además, se ha desarrollado un método de monitorización mediante espectrometría de masas por inmunoprecipitación para cuantificar A β 42 y A β 40 en el plasma, que también muestra diferencias entre pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles. Esto sugiere que estos métodos podrían ser útiles para la detección temprana y el seguimiento de la enfermedad de Alzheimer (Ovod et al., 2017).

Proteína Tau

El t-Tau es el único biomarcador sérico o plasmático que distingue a los pacientes con enfermedad de Alzheimer de los controles, pero su solapamiento con los controles limita su utilidad diagnóstica (Olsson et al., 2016). Sin embargo, estudios longitudinales han mostrado correlaciones entre niveles plasmáticos de Tau y deterioro cognitivo posterior, así como atrofia cerebral y cambios en el metabolismo cerebral (Fiandaca et al., 2015). Además, técnicas analíticas que se centren en fragmentos específicos de Tau podrían mejorar su rendimiento como biomarcador, como el análisis de preparaciones de exosomas enriquecidas con neuronas (Janeiro et al., 2021).

Proteína NFL

La proteína NFL es el biomarcador más estudiado en la enfermedad de Alzheimer y se ha demostrado que su concentración en sangre es mayor en pacientes con esta enfermedad en comparación con sujetos sanos de la misma edad. Estudios sugieren que la cuantificación de NFL en sangre podría ser útil como biomarcador de neurodegeneración incluso en etapas preclínicas (Mattsson et al., 2017).

Aunque la proteína NFL no es específica de la enfermedad de Alzheimer, ya que también se eleva en otras enfermedades neurodegenerativas y condiciones inflamatorias o traumáticas, su determinación en sangre de manera semiautomática permite un seguimiento continuo de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. En el futuro, la NFL plasmática podría utilizarse como parte de un test simple y no invasivo para la evaluación inicial de pacientes con problemas cognitivos, especialmente para descartar enfermedades neurodegenerativas (Janeiro et al., 2021).

2.5 Prevención

Aunque no hay evidencia sólida de métodos farmacológicos o no farmacológicos para prevenir el deterioro cognitivo por la enfermedad de Alzheimer, hay motivos para ser optimistas sobre la efectividad de intervenciones multifacéticas que incluyan ejercicio, cambios en el estilo de vida y estimulación cognitiva, combinadas con la atención en otros comportamientos modificables (Butler et al., 2018).

Estrategias médicas y de estilo de vida, implementadas en la mediana edad o antes, pueden reducir el impacto de lesiones cerebrovasculares en el cerebro. Por ejemplo, un estudio sobre la reducción agresiva de la presión arterial en personas inicialmente sin problemas cognitivos, en un

rango de edad de 50 años o más (con un 28% de participantes mayores de 75 años), mostró una disminución en el desarrollo de deterioro cognitivo leve y demencia (Williamson et al., 2019). Sin embargo, existe debate sobre la seguridad de reducir la presión arterial a niveles específicos en personas mayores. Reducir la carga total de enfermedad cerebral en regiones críticas para la cognición podría retrasar el desarrollo de síntomas relacionados con la enfermedad de Alzheimer (Knopman et al., 2021).

2.6 Tratamiento

Para pacientes con deterioro cognitivo debido a la enfermedad de Alzheimer, los tratamientos de las comorbilidades pueden influir en su función cognitiva y actividades diarias. La depresión y la ansiedad pueden manejarse con medicamentos, pero se deben evitar aquellos con propiedades anticolinérgicas y utilizar dosis más bajas de fármacos psicoactivos. El tratamiento de los trastornos del sueño, como la apnea obstructiva del sueño, puede requerir dispositivos orales o nasales. La pérdida de audición y visión comórbida presenta desafíos adicionales en el manejo de la enfermedad, ya que los dispositivos para corregirlas pueden ser difíciles de ajustar y usar (Knopman et al., 2021).

Los trastornos de la marcha y el equilibrio también deben abordarse, considerando otras posibles causas además del Alzheimer. El manejo del dolor en pacientes con deterioro cognitivo puede ser complicado debido a la dificultad para comunicar el dolor y las limitaciones en el uso de analgésicos potentes. En pacientes con demencia moderada o grave, el dolor puede manifestarse como agitación o irritabilidad, complicando su identificación y tratamiento (Tricco et al., 2017).

Los enfoques farmacológicos específicos para la enfermedad de Alzheimer se limitan a tres inhibidores de la colinesterasa (donepezilo, rivastigmina y galantamina) y el antagonista del receptor NMDA, memantina, que han mostrado modestos beneficios en la progresión de los síntomas por unos 6 meses. Los efectos adversos incluyen malestar gastrointestinal y, en menor medida, calambres musculares y dolores de cabeza. Sin embargo, ninguno de estos medicamentos afecta la biología subyacente de la enfermedad (Fink et al., 2018).

2.7 Mutaciones

Durante el desarrollo del cerebro humano, se acumulan mutaciones somáticas, algunas de las cuales pueden ser silenciosas pero útiles para rastrear linajes celulares. Sin embargo, mutaciones

que alteran la fisiología celular pueden causar trastornos neurológicos del desarrollo, como hemimegalencefalia y displasia cortical focal. Estas mutaciones también pueden afectar la fisiología neuronal, contribuyendo a la epileptogenicidad. Además, las mutaciones somáticas han revelado el origen celular potencial de ciertos cánceres, como el glioblastoma (Miller et al., 2021).

Los estudios sobre formas hereditarias de la enfermedad de Alzheimer han revelado varios genes autosómicos dominantes, incluidos APP, PSEN1 y PSEN2, que afectan la producción y el procesamiento de la proteína precursora de amiloide, aumentando la formación de placas de amiloide. Sin embargo, estas mutaciones representan menos del 1% de los casos, mientras que estudios genéticos más amplios han identificado el alelo APOE4 y genes como TREM2 como factores de riesgo para la enfermedad de inicio tardío (Lodato et al., 2018).

2.8 Mutaciones *APOE4* - Polimorfismo rs429358

Más de 600 genes han sido examinados como posibles factores de susceptibilidad para la enfermedad de Alzheimer. APOE es un polimorfismo de susceptibilidad, destacándose como el factor de riesgo genético más significativo para la EA de inicio tardío que se manifiesta después de los 65 años. La presencia del alelo *APOE4* incrementa el riesgo de demencia entre 3 y 4 veces en los individuos heterocigotos y entre 12 y 15 veces en los homocigotos en comparación con aquellos que portan el alelo *APOE3* (Knopman et al., 2021).

El gen APOE codifica la principal apoproteína integrante de los quilomicrones, y las mutaciones en este gen pueden dar lugar a la disbetalipoproteinemia, una condición caracterizada por un aumento en la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos. Se han identificado tres variantes alélicas comunes de ApoE, conocidas como ApoE2, ApoE3 (la variante más prevalente) y ApoE4, definidas por dos SNPs, rs429358 y rs7412, que producen las proteínas ApoE2, ApoE3 y ApoE4, respectivamente (Defagó & Eynard, 2022). Estos 3 alelos dan origen a 6 genotipos, 3 homocigotos ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 3/\epsilon 3$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$) y tres heterocigotos ($\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ y $\epsilon 3/\epsilon 4$). La tabla 2 muestra los distintos genotipos que se pueden presentar.

Tabla 2.*Genotipos resultantes del gen APOE.*

RS429358 (CODÓN 112)	RS7412 (CODÓN 158)	ALELO
T/T	T/T	$\epsilon 2/\epsilon 2$
T/T	C/C	$\epsilon 3/\epsilon 3$
C/C	C/C	$\epsilon 4/\epsilon 4$
T/T	T/C	$\epsilon 2/\epsilon 3$
T/C	T/C	$\epsilon 2/\epsilon 4$
T/C	C/C	$\epsilon 3/\epsilon 4$

Formas alélicas de la APOE debidas a SNPs en los nucleótidos 334 (primer nucleótido del codón 112) y 472 (segundo nucleótido del codón 158), donde se sustituye una base timina (T) por una citosina (C). Fuente: Martinez et al. 2020.

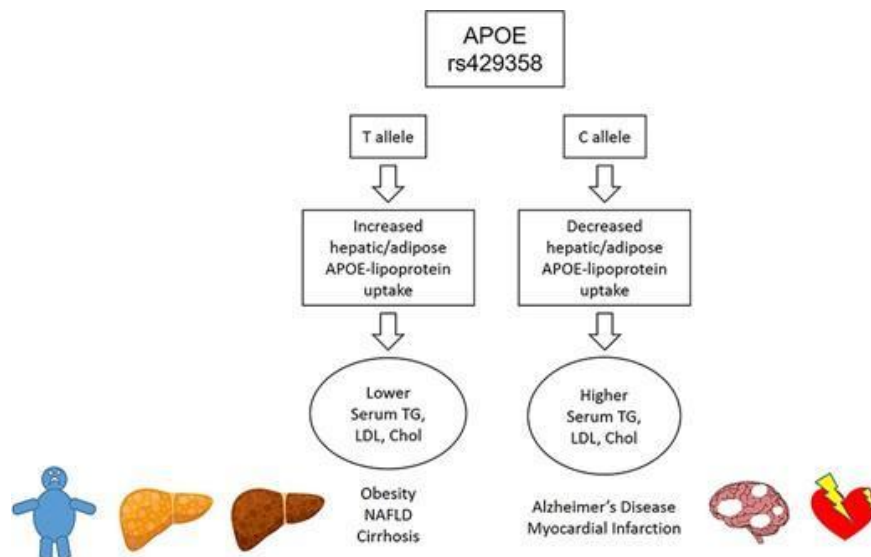
El alelo más común del SNP rs429358 es el T, y no se asocia con riesgo. Sin embargo, cuando el alelo es C y también contiene la variante rs7412 (C/C o C/T, denominada alelo APOE4), aumenta el riesgo de enfermedad de Alzheimer y enfermedad cardiovascular (ECV). Por lo tanto, la presencia de la isoforma ApoE4 se identifica como un factor de riesgo significativo, mientras que la isoforma ApoE3 no muestra una asociación con un mayor riesgo de ECV. En cuanto a la ApoE2, su relación con la ECV ha sido reportada de manera más ambigua, y parece depender de otros factores genéticos y ambientales (Atis et al., 2016).

En la investigación de Palmer et al. (2021), el análisis de asociación fenotípica amplia (PheWAS) de APOE rs429358 examinó los efectos de APOE rs429358-T en Biobanco del Reino Unido y encontró asociaciones con marcadores de deterioro hepático, incluyendo a la alanina aminotransferasa aumentada, esteatosis hepática en imágenes por resonancia magnética (MRI), Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica y cirrosis. Además, se observaron asociaciones con un aumento del índice de masa corporal, circunferencia de cintura, riesgo de diabetes tipo 2, pancreatitis y coleditiasis, así como niveles reducidos de colesterol total y colesterol de lipoproteínas de baja densidad y niveles elevados de colesterol de lipoproteínas de alta densidad, proteína C-reactiva y apolipoproteína A. También confirmó la asociación con un menor riesgo de enfermedad de Alzheimer y enfermedad cardíaca isquémica. Estos efectos persisten incluso después

de ajustar por otros dos SNPs relacionados con APOE. En la figura 4 un modelo del efecto de los alelos T y C de rs429358 en enfermedades y características humanas.

Figura 4.

Modelo de los alelos T y C de rs429358.



Fuente: (Palmer et al., 2021).

2.9 Reacción en cadena de la polimerasa

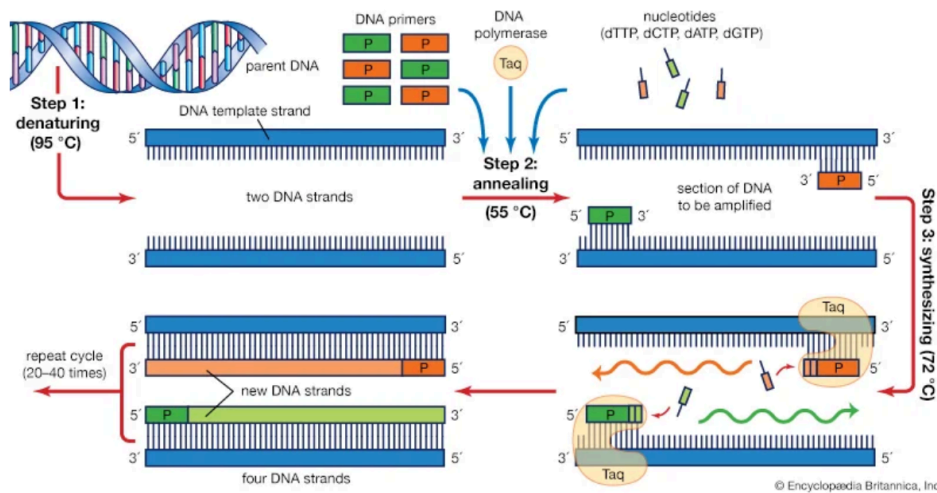
2.9.1 Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica utilizada para generar numerosas copias de un segmento específico de ADN de manera rápida y precisa. Esta técnica permite a los investigadores obtener grandes cantidades de ADN necesarias para varios experimentos y procedimientos en biología molecular, análisis forense, biología evolutiva y diagnóstico médico (Lotha, 2024).

La técnica de PCR fue desarrollada en 1983 por Kary B. Mullis, un bioquímico estadounidense que ganó el Premio Nobel de Química en 1993 por su invención. Antes del desarrollo de la PCR, los métodos utilizados para amplificar, o generar copias de fragmentos de ADN recombinante eran lentos y laboriosos. En contraste, una máquina diseñada para llevar a cabo reacciones de PCR puede completar numerosas rondas de replicación, produciendo miles de millones de copias de un fragmento de ADN, en solo unas pocas horas (Tayyeb & Basit, 2023).

Figura 5.

Proceso de la PCR.



Fuente: (Lotha, 2024).

2.9.2 Componentes

• Taq Polimerasa

En el caso de la PCR, la enzima más utilizada es la Taq polimerasa, proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Esta bacteria habita en ambientes de alta temperatura, como aguas termales y fuentes hidrotermales, lo que ha dotado a su ADN polimerasa de una característica crucial: la termoestabilidad (Saghatelyan et al., 2021).

La Taq polimerasa muestra su máxima actividad en temperaturas óptimas para la PCR, las cuales están por encima de las que serían compatibles con la mayoría de las ADN polimerasas humanas o de *E. coli*. Esta característica termoestable de la Taq polimerasa la hace ideal para la PCR, donde se requieren ciclos de altas temperaturas para la desnaturalización del ADN molde y la separación de sus cadenas (Turvey et al., 2022).

• ADN molde y Cebadores

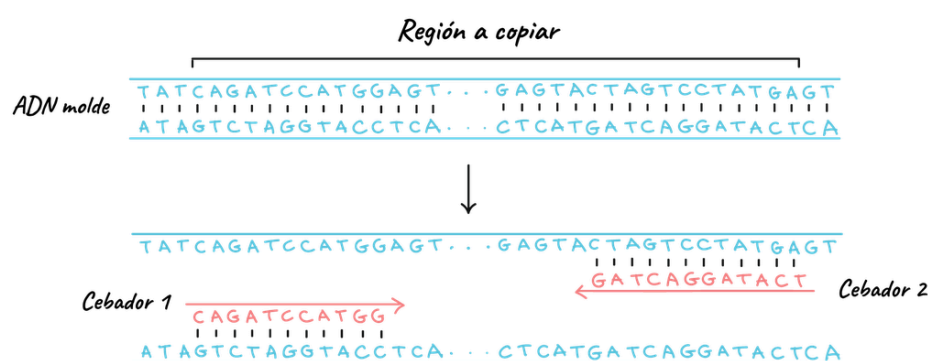
En el proceso de PCR, la Taq polimerasa, al igual que otras enzimas ADN polimerasas, requiere la presencia de cebadores, que son secuencias cortas de nucleótidos que actúan como

puntos de partida para la síntesis de ADN. Estos cebadores son seleccionados por el investigador y determinan qué región de ADN será amplificada durante la reacción de PCR (Bhat & Rao, 2020).

Por lo general, los cebadores son fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla, con una longitud típica de unos pocos nucleótidos. En cada ciclo de PCR se utilizan dos cebadores diseñados específicamente para flanquear la región de interés, lo que significa que se unen a cadenas complementarias del molde de ADN sólo en los extremos de la región a amplificar (Figura 6). La unión de los cebadores al molde de ADN se basa en la complementariedad de bases, y una vez unidos, la Taq polimerasa extiende los cebadores, lo que resulta en la amplificación de la región de ADN situada entre ellos.

Figura 6.

Cebadores y ADN molde.

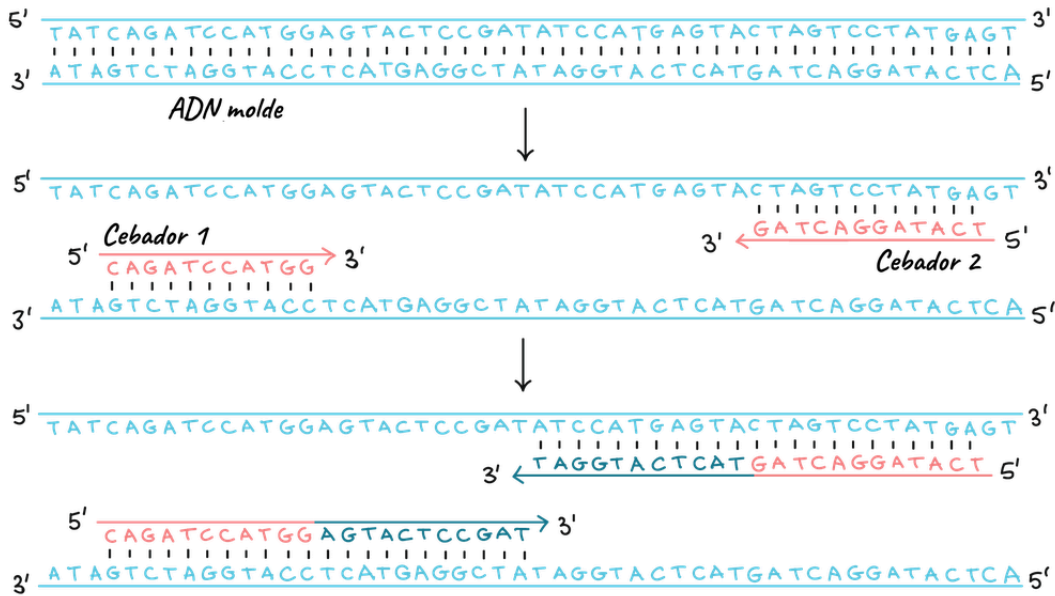


Fuente: (Khan Academy, 2018).

En la figura 7 se puede observar que ambos cebadores se alinean "hacia el interior" al unirse, es decir, en dirección de 5' a 3', hacia la región objetivo a replicar. Al igual que otras polimerasas de ADN, la Taq polimerasa únicamente puede sintetizar ADN en la dirección de 5' a 3'. Cuando los cebadores se extienden, la región ubicada entre ellos es duplicada (Khan Academy, 2018).

Figura 7.

ADN molde y dirección de cebadores.



Fuente: (Khan Academy, 2018).

- **Nucleótidos**

Los nucleótidos constituyen los componentes básicos del ADN y se componen de cuatro bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y timina. Por lo tanto, para la síntesis de nuevas moléculas de ADN, es imprescindible disponer de estos cuatro tipos de desoxirribonucleótidos trifosfato. Estas bases nitrogenadas actúan como los ladrillos fundamentales para la construcción de la doble hélice del ADN durante la replicación y la síntesis de nuevas cadenas de ADN. La combinación específica de estas bases determina la secuencia genética única de un organismo y es fundamental para la transmisión de información genética de una generación a otra (Esiobu et al., 2021).

- **Magnesio**

En la técnica de PCR, se emplean iones divalentes de magnesio como cofactores indispensables para la actividad de la ADN polimerasa. La presencia de estos cationes de carga positiva es crucial para el correcto funcionamiento de la enzima polimerasa. Por lo general, se adiciona cloruro de magnesio a la mezcla de reacción, y al disociarse, este compuesto libera iones

de magnesio con una carga eléctrica de +2, los cuales son necesarios para la catalización de la reacción de amplificación del ADN (Zhussupova, 2022).

- **Termociclador**

Un termociclador es un dispositivo que controla y regula la temperatura durante cada ciclo de la PCR. Este equipo es fundamental para acelerar significativamente el proceso de PCR, ya que permite modificar la temperatura de la solución de reacción en múltiples ocasiones de manera automatizada. Gracias al termociclador, se logra realizar la técnica de PCR de manera más eficiente y rápida, lo que resulta en una amplificación precisa y reproducible del ADN objetivo. Este control preciso de la temperatura es esencial para llevar a cabo los diferentes pasos de la PCR, como la desnaturalización del ADN, la hibridación de los cebadores y la extensión de las cadenas de ADN (Cruz et al., 2021).

2.9.3 Etapas

Desnaturalización

En la figura 8, se presentan las fases de la PCR. Primero, es esencial desnaturalizar el ADN, lo que significa separar las dos hebras de la molécula. Esta fase inicial, conocida como desnaturalización, se realiza elevando la temperatura a aproximadamente 94°C. Este incremento térmico permite que las hebras se separen completamente, preparando el ADN para la siguiente etapa del proceso. Sin esta separación, la amplificación del ADN no sería posible (Bhat & Rao, 2020).

Hibridación

El segundo paso implica reducir la temperatura para que los cebadores puedan unirse de manera complementaria al ADN molde. Esta etapa, denominada hibridación, usualmente se lleva a cabo a temperaturas que varían entre 35 y 60°C. Durante esta fase, los cebadores se alinean con las secuencias específicas del ADN molde, permitiendo la formación de nuevas hebras de ADN en las siguientes etapas del proceso (Chauhan et al., 2022).

Elongación

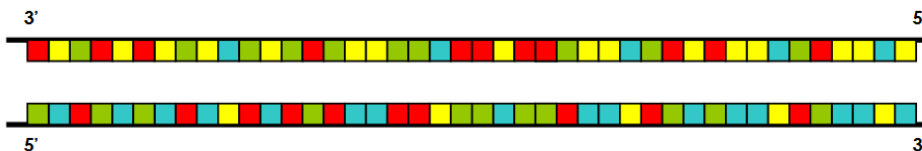
Finalmente, durante la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa añade nucleótidos complementarios comenzando desde el extremo 3' libre donde los cebadores se han

unido al ADN molde. La temperatura requerida para esta etapa varía según la polimerasa utilizada; en el caso de la Taq polimerasa, esta fase generalmente se realiza a 72°C (Pérez, 2018).

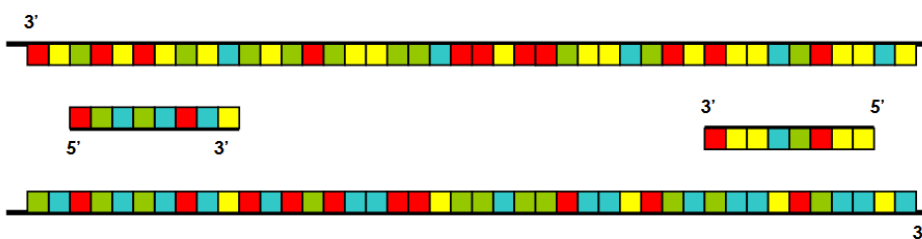
Figura 8.

Fases de la PCR.

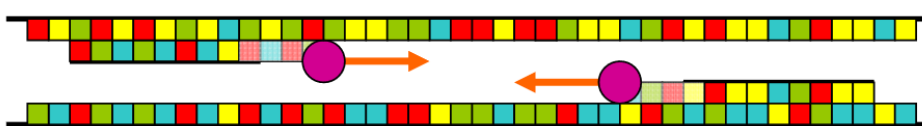
1. Desnaturalización



2. Hibridación



3. Elongación

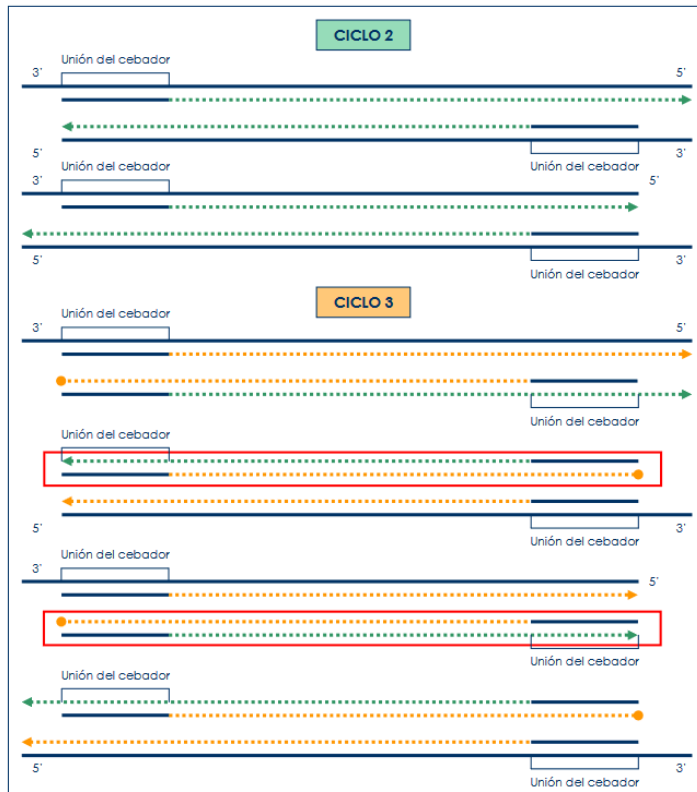


Fuente: (Pérez, 2018).

La PCR se lleva a cabo repitiendo las tres fases mencionadas anteriormente entre 25 y 35 veces, es decir, realizando entre 25 y 35 ciclos. Si observamos lo que ocurre desde el primer ciclo, notamos que después de varios ciclos se generan fragmentos de ADN cuyo tamaño está definido por los puntos de unión de los cebadores (ver figura 9). De hecho, tras algunos ciclos adicionales, los fragmentos predominantes serán aquellos que tienen sus extremos delimitados por los cebadores (Pérez, 2018).

Figura 9.

Representación esquemática de los productos de amplificación de PCR.



Fuente: (Pérez, 2018).

Capítulo III

3. Metodología

3.1 Diseño y tipo de estudio

El presente trabajo es un estudio técnico experimental realizado en el Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, utilizando ADN comercial, durante el ciclo académico Marzo-Agosto 2024.

3.2 Diseño de los primers/cebadores

El diseño de los primers se realizó en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI), la cual cuenta con una amplia gama de bases de datos biológicas y médicas, incluyendo GenBank en la que localizamos la secuencia de ADN de Interés (Figura 10).

Figura 10.

Secuencia de 860 Nucleótidos Ubicada en la Región 19q13.32 del ADN que Codifica Parte de la Proteína APOE.

```

7741 CTCGGCCGCA GGGCGCTGAT GGACGAGACC ATGAAGGAGT TGAAGGCCTA CAAATCGGAA
7801 CTGGAGGAAC AACTGACCCC GGTGGCGGAG GAGACGCGGG CACGGCTGTC CAAGGAGCTG
7861 CAGGCGGCGC AGGCCCGGCT GGGCGCGGAC ATGGAGGACG TGTGCGGCCG CCTGGTGCAG
7921 TACCGCGGCG AGGTGCAGGC CATGCTCGGC CAGAGCACCG AGGAGCTGCG GGTGCGCCTC
7981 GCCTCCCACC TGCGCAAGCT GCGTAAGCGG CTCCTCCGCG ATGCCGATGA CCTGCAGAAG
8041 CGCCTGGCAG TGT ACC GGC CGGGGCCCGC GAGGGCGCCG AGCGCGGCCT CAGCGCCATC
8101 CGCGAGCGCC TGGGGCCCCCT GGTGGAACAG GGCCGCGTGC GGGCCGCCAC TGTGGGCTCC
8161 CTGGCCGGCC AGCCGCTACA GGAGCGGGCC CAGGCCTGGG GCGAGCGGCTGCGCGCGCGG
8221 ATGGAGGAGA TGGGCAGCCG GACCCGCGAC CGCCTGGACG AGGTGAAGGA GCAGGTGGCG
8281 GAGGTGCGCG CCAAGCTGGA GGAGCAGGCC CAGCAGATAC GCCTGCAGGC CGAGGCCTTC
8341 CAGGCCCCGC TCAAGAGCTG GTTCGAGCCC CTGGTGAAG ACATGCAGCG CCAGTGGGCC
8401 GGGCTGGTGG AGAAGGTGCA GGCTGCCGTG GGCACCAGCG CCGCCCCTGT GCCCAGCGAC
8461 AATCACTGAA CGCCGAAGCC TGCAGCCATG CGACCCACG CCACCCCGTG CCTCCTGCCT
8521 CCGCGCAGCC TGCAGCGGGA GACCCTGTCC CCGCCCAGC CGTCCTCCTG GGGTGGACCC
8581 TAGTTTAATA AAGATTCACC AAGTTTCACG CATCTGCTGG CCTCCCCCTG TGATTTCCTC

```

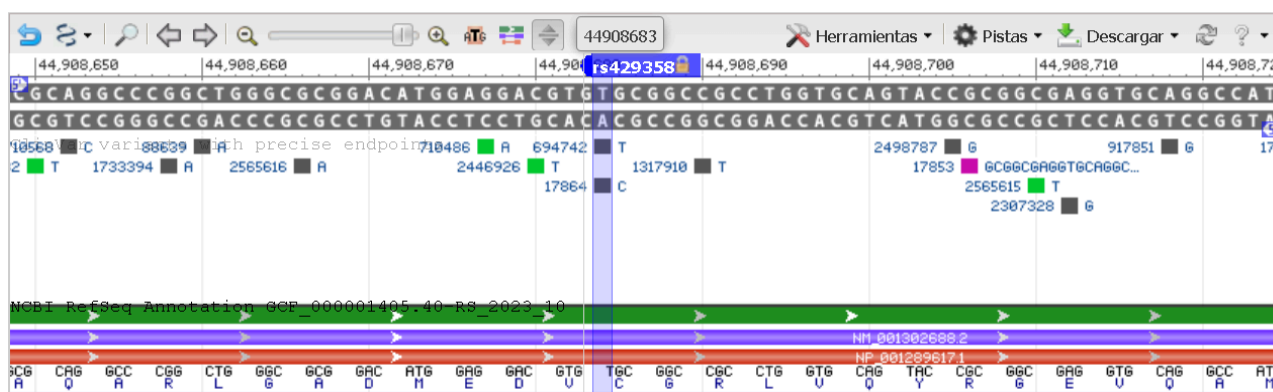
En azul el inicio y fin del exón 4. En amarillo la posición del polimorfismo rs429358 que permite identificar el alelo *APOE4* y en verde el polimorfismo rs7412 que permite identificar el resto de

alelos (*APOE2* y *APOE3*). Fuente: (NCBI, 2024).

Para el diseño de los primers se buscó el polimorfismo rs429358 en el que el alelo silvestre cuenta con el nucleótido de Timina (T) y en el mutante hay un cambio de este por una Citosina (C). Además, para el diseño de los primer/cebadores se tuvo en cuenta la temperatura (considerando que no puede haber diferencia entre el forward (F) y el reverse (R) de 2%, el % de citosinas y guaninas inferior al 50%, y que la autocomplementariedad sea baja.

Figura 11.

Posición en el Genoma del Polimorfismo rs429358.

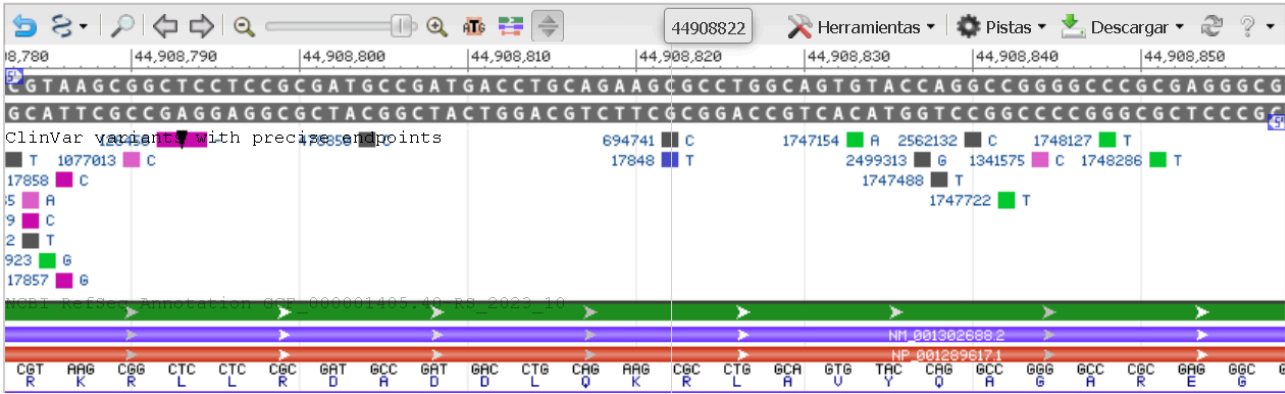


Fuente: (NCBI, 2024).

Para que la investigación abarque los demás polimorfismos de la APOE y no sólo el *APOE4* se decidió también incluir la variante que se encuentra en la posición 40908822 del Genoma en la que existe una mutación en el que el alelo silvestre cuenta con una Citosina (C) y la mutante una Timina (T) lo que nos permitirá diferenciar entre la *APOE2* y *APOE3*.

Figura 12.

Posición en el genoma del polimorfismo rs7412.



Fuente: (NCBI, 2024).

Después de verificar que cumpla con las consideraciones expuestas anteriormente se optó por los siguientes primers/cebadores.

Tabla 3.

Primers/cebadores diseñados para el fragmento rs429358 y rs7412.

Primer	Secuencia (5'-3')	Conc.	%G-C	TM 1M	TM 50 nM
R1	TGCCCATCTCCTCCATC	37,9 nm	58,82%	79 °C	58 °C
F1	TGGAGGAACAACCTGACCC	32 nm	55.56%	78 °C	57 °C
R4	GCCCATCTCCTCCATCC	37 nm	55,85%	80 °C	59 °C
F4	GGAACCTGGAGGAACAACCTG	39,8 nm	55,43%	77 °C	56 °C

Nota: Conc: Concentración de primers. %G-C: Porcentaje de Guaninas-Citosinas. TM 1M: Temperatura de fusión a 1 molar. TM 50 nM: Temperatura de fusión a 50 nanomolar.

3.3 Verificación de la especificidad in SILICO

Posterior al diseño de de primers se realiza una análisis computacional (análisis in silico) en la plataforma UCSC Genome Browser donde se verifica la especificidad de los primers al fragmento rs429358.

3.4 Cuantificación de la cantidad de ADN

Para la estandarización del fragmento rs429358, se utilizaron seis muestras de ADN comercial

(Human HCT116 DKO Non-Methylated DNA Marca Zymo). La concentración de cada muestra de ADN comercial se determinó con un equipo de la marca Bioevopeak, mediante la medición de absorbancias para obtener las concentraciones de ADN como se indica en la Tabla 13.

3.5 Estandarización de PCR

En el diseño experimental original se seleccionaron primers/cebadores que amplifican la fracción rs429358. Sin embargo, durante la fase de amplificación se observó la inespecificidad de los primers/cebadores dado por la autocomplementariedad de los mismos, lo que resultó en la formación de estructuras secundarias no específicas, esto impide la correcta hibridación de la secuencia de interés, en consecuencia la amplificación del polimorfismo rs429358 no se llevó a cabo como se plantean en los objetivos generales a pesar de las diferentes condiciones a las cuales fueron sometidos los primers/cebadores sintetizados y probados in silico. En el presente trabajo se presentan todas las condiciones a las cuales fueron sometidas las muestras de ADN comercial siguiendo los protocolos del fabricante en donde se puede observar los resultados obtenidos.

3.5.1 Reconstitución de Primers

Previo a la estandarización se reconstituyeron los primers liofilizados. Para ello se debe pipetear un volumen de agua destilada, el cual se obtiene al multiplicar por 10 la concentración inicial, se obtiene de esta manera una concentración final de 100 μmol . Luego se homogeneiza en el vortex y se centrifuga. Los primers reconstituidos se deben almacenar a -20°C .

Tabla 4.

Reconstitución de los primers.

Primer	Concentración	Vol. de Agua bidestilada	Concentración Final
F1	32,0 nmol	320 μL	100 μmol
R1	37,9 nmol	379 μL	100 μmol
F4	39,8 nmol	398 μL	100 μmol
R4	37 nmol	370 μL	100 μmol

En el diseño experimental se establecieron cinco protocolos en donde se buscó las mejores condiciones para que se amplificaba el segmento de interés.

3.5.2 Protocolo 1

En la tabla 5 se presentan las concentraciones de los diferentes reactivos, para este protocolo se emplearon los primers F1 y R1.

Tabla 5.

Condiciones para el protocolo 1, primers F1 y R1.

	1 MUESTRA	x 6 MUESTRAS	Muestras de ADN utilizado
PCR master mix	22,5 uL	135 uL	R1F1: 1 a 2 b 3 c 4 d 5 e 6 f
F1	0,5 uL	3 uL	
R1	0,5 uL	3 uL	
ADN	1 uL	1 uL	
H2O	0,5 uL	3 uL	
Total	25 uL	150 uL	

3.5.3 Protocolo 2

Para este protocolo se emplearon los primers F1, R1 y F4, R4. En este protocolo se aumentó el número de ciclos de 25 a 35 ciclos.

Tabla 6.

Condiciones para el protocolo 2 del par de primers F1, R1 y F4, R4.

	1 MUESTRA	x 3 MUESTRAS	Muestras de ADN utilizado
PCR master mix	22,5 uL	67,5 uL	R1F1: 1 a 2 b 3 c R4F4: 4 d 5 e 6 f
F1	0,5 uL	1,5 uL	
R1	0,5 uL	1,5 uL	
ADN	1 uL	1 uL	
H2O	0,5 uL	1,5 uL	
Total	25 uL	75 uL	

3.5.4 Protocolo 3

Para este protocolo se decide utilizar rampas de temperaturas como se detalla en la tabla 10.

Tabla 7.

Condiciones para el protocolo 3 del par de primers F1, R1..

	1 MUESTRA	x 7 MUESTRAS	Muestras de ADN utilizado
PCR master mix	22,5 uL	157,5 uL	R1F1: 1 a 2 b 3 c 4 d 5 e 6 f
F1	0,5 uL	3,5 uL	
R1	0,5 uL	3,5 uL	
ADN	1 uL	1 uL	
H2O	0,5 uL	3,5 uL	
Total	25 uL	175 uL	

3.5.5 Protocolo 4

Se emplearon los primers: R1F1., R4F4 y se aumentó la concentración del primer a 50 % (50 umol: 5 uL de solución madre y 5 uL de agua bidestilada).

Tabla 8.

Condiciones para el protocolo 4 de primers F1, R1.

	1 MUESTRA	1 MUESTRA	Muestras de ADN utilizado
PCR master mix	22 uL	22,5 uL	R1F1: 6 f R4F4: 6 f
F1	1 uL	1 uL	
R1	1 uL	1 uL	
ADN	1 uL	0,5 uL	
Total	25 uL	25 uL	

3.5.6 Protocolo 5

Se emplearon los primers: R1F1., R4F4 y se aumentó la concentración del primer al 100 % (100 umol: primers sin diluir).

Tabla 9.

Condiciones para el protocolo 5 el par de primers F1, R1 y F4, R4.

	1 MUESTRA	1 MUESTRA	Muestras de ADN utilizado
PCR master mix	22 uL	22,5 uL	R1F1: 6 f R4F4: 6 f
F1	1 uL	1 uL	
R1	1 uL	1 uL	
ADN	1 uL	0,5 uL	
Total	25 uL	25 uL	

3.5.7 Temperaturas y tiempos óptimos para la PCR

Durante la estandarización se emplearon distintas temperaturas de hibridación que se resumen en la tabla 10.

Tabla 10.

Temperaturas y tiempos para la marcha experimental de los distintos protocolos.

	Temperaturas y tiempos				
	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
Desnaturalización	94°C por 4 minutos.	94°C por 4 minutos.	94°C por 4 minutos.	94°C por 4 minutos.	94°C por 4 minutos.
Ciclos	25 ciclos, 94°C por 15s.	35 ciclos, 94°C por 15 s.	35 ciclos, 94°C por 15 s.	35 ciclos, 94°C por 15 s.	35 ciclos, 94°C por 15 s.
Hibridación	57 °C por 30 segundos.	57 °C por 30 segundos.	Rampas: °C por 30 s. 1-2: 55 °C. 3-4: 56 °C. 5-6: 57 °C. 7-8: 58 °C. 9-10: 59 °C. 11-12: 60 °C.	58 °C por 30 segundos.	58 °C por 30 segundos.
Extensión	72 °C por 1 minuto.	72 °C por 1 minuto.	72 °C por 1 minuto.	72 °C por 1 minuto.	72 °C por 1 minuto.

Finalización	4 °C.	4 °C.	4 °C.	4 °C.	4 °C.
Resultado	No se observa un amplicón, por lo que se aumentan los ciclos. No se usa bromuro de etidio.	Se aumentan los ciclos y se tiñe con bromuro de etidio sin embargo el amplicón obtenido no es específico.	Se agregan rampas de temperatura en la hibridación partiendo desde 55 °C en el carril 1-2 hasta llegar a 60 °C en el carril 11-12.	Se cambió la concentración del primers (50 %), además se modificó la concentración de ADN utilizando 1ul por cada corrida.	Se cambió únicamente la concentración del primers hasta llegar a un 100 % con esto se determinó la autocomplementariedad y la inespecificidad para el segmento de interés.

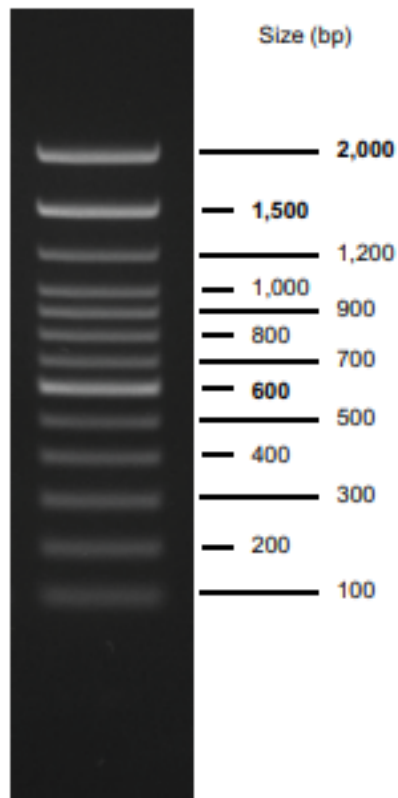
3.6 Verificación del amplicón mediante Electroforesis

En los protocolos, dos, tres, cuatro y cinco se usó gel de agarosa en concentración de 1,2%, teñido con 4 ul de bromuro de etidio (Anexo 3). La separación del resultado de la PCR se realizó en la cámara de electroforesis de la marca Enduro, con un voltaje de 90-15V durante 45 minutos para posterior verificar las bandas en cámara UV, en el mismo gel se corrió un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) de la marca INVITROGEN (Figura 13).

Al revelar el resultado de la electroforesis, se evidenció que no se logró amplificar el segmento de interés, ya que en todos los geles se observa que las muestras alcanzan la región de 100 pb. Esto nos permite concluir que no se obtuvo un amplicón, debido a que nuestro segmento de interés debería encontrarse en la región cercana a los 600 pb (435-439 pb), correspondiente a la banda más brillante del marcador de peso molecular (Figuras 13, 14 y 17).

Figura 13.

Marcador de peso molecular de 100pb.



Fuente: (Invitrogen, 2024).

Capítulo IV

4. Resultados y discusión

4.1 Resultados

4.1.1 PCR in silico

En el presente diseño experimental se probó la PCR in silico con los primers/cebadores previamente sintetizados en la plataforma UCSC GENOME BROWSER, en donde se pudo determinar la amplificación del gen de interés, datos expresados en la siguiente tabla:

Tabla 11.

PCR in silico. Resaltado en amarillo la posición del polimorfismo rs429358 y en verde el rs7412.

Primers	PCR in silico	pb	Temperatura
R1/F1	TGGAGGAACAACCTGACCCcggtggcggaggagacgcgggcacggct gtccaaggagctgcaggcggcgaggccccggctgggcgcggacatggaggacgtg gcggccgcctggtgcagtaccgcggcgaggtgcaggccatgctcgccagagcaccg aggagctgcgggtgcgcctgcctccacctgcgcaagctgcgtaagcggctcctccgc gatgccgatgacctgcagaagcgctggcagtgtagggccggggcccgaggggc gccgagcgcggcctcagcgccatccgcgagcgcctggggcccctggtggaacagggc cgctgcggggcccgccactgtgggctccctggccggccagccgctacaggagcgggccc caggcctggggcgagcggctgcgcgcgcGATGGAGGAGATGGGCA	435	Forward: 56.8 °C tgagggaacaactgac cc Reverse: 57.9 °C tgeccatctcctccatc
R4/F4	GGAACCTGGAGGAACAACCTGaccccggtggcggaggagacgcgggc acggctgtccaaggagctgcaggcggcgaggccccggctgggcgcggacatggagg acgtgtgcggccgcctggtgcagtaccgcggcgaggtgcaggccatgctcgccagag caccgaggagctgcgggtgcgcctgcctccacctgcgcaagctgcgtaagcggctc ctccgcgatgccgatgacctgcagaagcgctggcagtgtagggccggggcccgcg agggcgccgagcgcggcctcagcgcgatocgcgagcgcctggggcccctggtgga acagggcccgctgcggggcccgccactgtgggctccctggccggccagccgctacagga gcggggcccgagcctggggcgagcggctgcgcgcgcGGATGGAGGAGAT GGGC	439	Forward: 55.5 °C ggaactggagggaaca actg Reverse: 58.8 °C gcccattctcctccatcc

4.1.2 Cuantificación del ADN

El ADN comercial utilizado en este experimento fue Human HCT116 DKO Non-Methylated DNA de la marca Zymo. Para cuantificar la concentración de ADN en cada muestra, se utilizó un equipo de la marca Bioevopeak. La absorbancia fue medida a 260 nm, que es la longitud de onda óptima para evaluar la concentración de ADN. Los resultados obtenidos se presentan en la *tabla 13*, proporcionando una visión clara de la cantidad de ADN disponible para su posterior uso en el análisis experimental.

Tabla 12.

Muestra de ADN cuantificado.

Muestra	Concentración del ADN
1a	19,5 ng/uL
2b	24,5 ng/uL
3c	23.4 ng/uL
4d	25,4 ng/uL
5e	19,6 ng/uL
6f	25,5 ng/uL

4.1.3 PCR in situ

En el primer protocolo se usaron las muestras de ADN cuantificadas anteriormente (concentración menor a 25 ng/uL), se inició con 25 ciclos a 94°C por 15 segundos con una temperatura de hibridación de 57 °C por 30 segundos, posterior a someter a estas condiciones se corrió en gel de agarosa en una concentración de 1,2 % como se observa en la figura 14. En el gel de electroforesis se puede verificar con mucha tenuidad un amplicón no especificado entre las posiciones 100 - 200 pares de bases, por esta razón se decidió modificar los parámetros con el fin de obtener una mejor imagen de las posiciones del amplicón.

Figura 14.

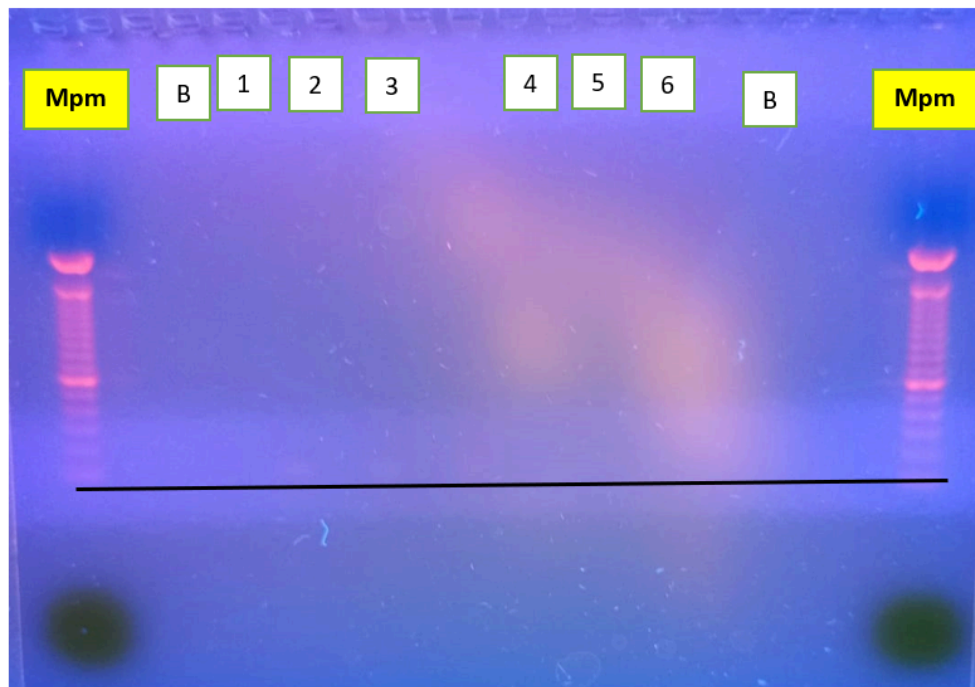
Gel de electroforesis en el primer protocolo (concentración de agarosa 1,2%). Carri B: Control negativo. Carril 1: muestra 1a. Carril 2: muestra 2b. Carril 3: muestra 3c. Carril 4: muestra 4d. Carril 5: muestra 5e. Carril 6: 6f. Carril Mpm: Marcador de peso molecular.



En el protocolo dos dado a la tenuidad del amplicón en el protocolo anterior se utilizó como agente marcador de intensidad al bromuro de etidio, además, se aumentaron los ciclos de desnaturalización, y se usaron los primers/cebadores R1F1 y F4R4, pasando de 25 a 35 ciclos a 94 °C por 15 segundos, se usó gel de agarosa para la electroforesis a una concentración de 1,2% como se puede observar en la figura 15. En este protocolo a pesar de que uso marcador de intensidad de color, el amplicón en este protocolo sigue siendo muy tenue e inespecífico, por lo que se decidió modificar los parámetros.

Figura 15.

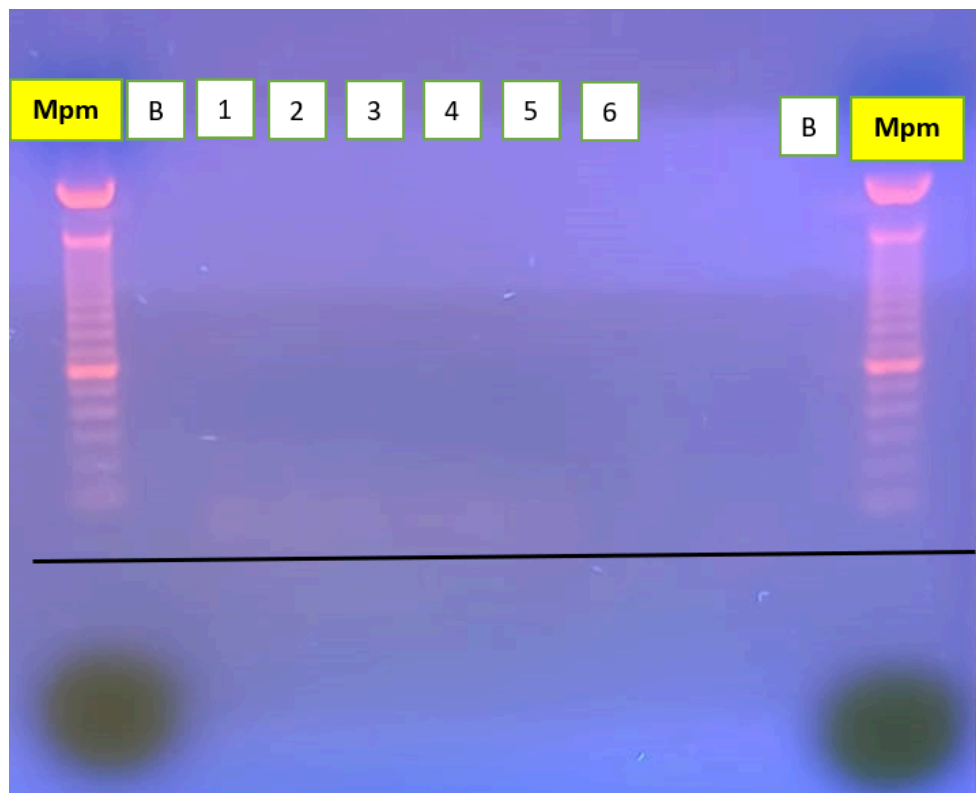
Gel de electroforesis en el segundo protocolo (concentración de agarosa 1,2%). Carri B: Control negativo. Carril 1: muestra 1a. Carril 2: muestra 2b. Carril 3: muestra 3c. Carril 4: muestra 4d. Carril 5: muestra 5e. Carril 6: 6f. Carril Mpm: Marcador de peso molecular. En el carril 1, 2 y 3 se usaron primers/cebadores R1/F1 y en carriles 4,5 y 6 se usaron primers/cebadores R4/F4.



En el tercer protocolo se usaron solo los primers/cebadores R1/F1 y se decidió utilizar rampas de temperatura de hibridación que van desde: 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C, 59 °C, 60 °C a 35 ciclos para posterior correr en gel de agarosa a una concentración de 1,2% como se observa en la figura 16. En este protocolo se evidencia de manera muy tenue la autocomplementariedad de los primers/cebadores a nivel de las 100 - 200 pb por lo que se decidió modificar condiciones como la concentración de los primers/cebadores y la concentración de ADN para el protocolo cuatro.

Figura 16.

Gel de electroforesis en el tercer protocolo (concentración de agarosa 1,2%). Carri B: Control negativo. Carril 1: muestra 1a, 55°C. Carril 2: muestra 2b, 56°C. Carril 3: muestra 3c, 57°C. Carril 4: muestra 4d, 58°C. Carril 5: muestra 5e, 59°C. Carril 6: 6f, 60°C Carril Mpm: Marcador de peso molecular.

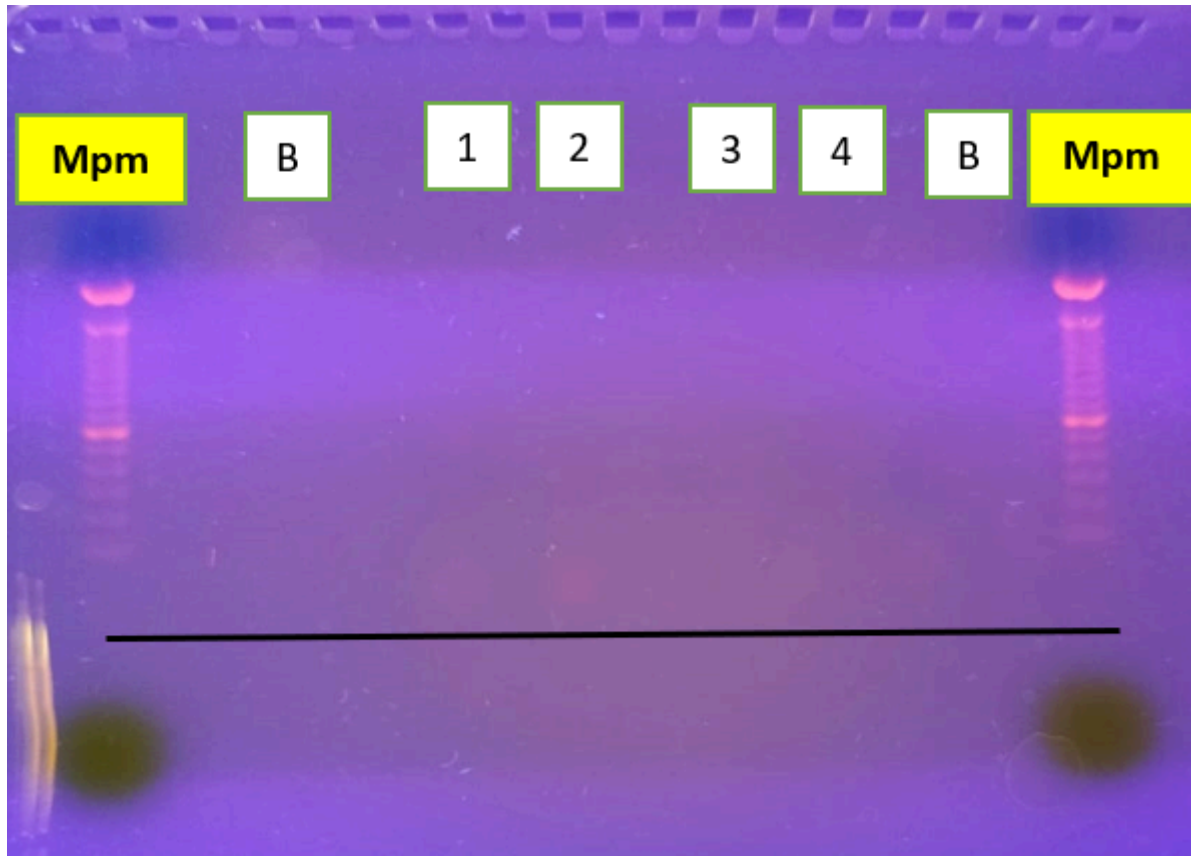


En el protocolo cuatro se decidió cambiar la concentración de los primers/cebadores pasando del 10% al que se usaba en los protocolos anteriores a 50 %, además, se decidió hacer dos pruebas, en donde a una muestra se dejó con la concentración de 1 ul de ADN y en otra muestra la concentración de 0,5 ul de ADN, se realiza las corridas solo con una muestra de ADN cambiando los parámetros especificados con anterioridad, se decide dejar la temperatura de hibridación a 58 °C por 30 segundos, además, se usa los primers F1/R1 y F4/R4 para posterior correr en gel de agarosa a una concentración de 1,2% como se observa en la figura 17. En este protocolo se puede determinar con mayor precisión la autocomplementariedad de los primers, además de su inespecificidad a la cadena de interes por lo que se pasa un protoco cinco aumentado únicamente la concentración de los primers/cebadores como prueba confirmatoria de la no especificidad de los mismos.

Figura 17.

Gel de electroforesis en el cuarto protocolo (concentración de agarosa 1,2%). Carri B: Control negativo. Carril 1: muestra 1a, ADN: 1uL. Carril 2: muestra 1a, ADN: 0,5 uL. Carril 3: muestra

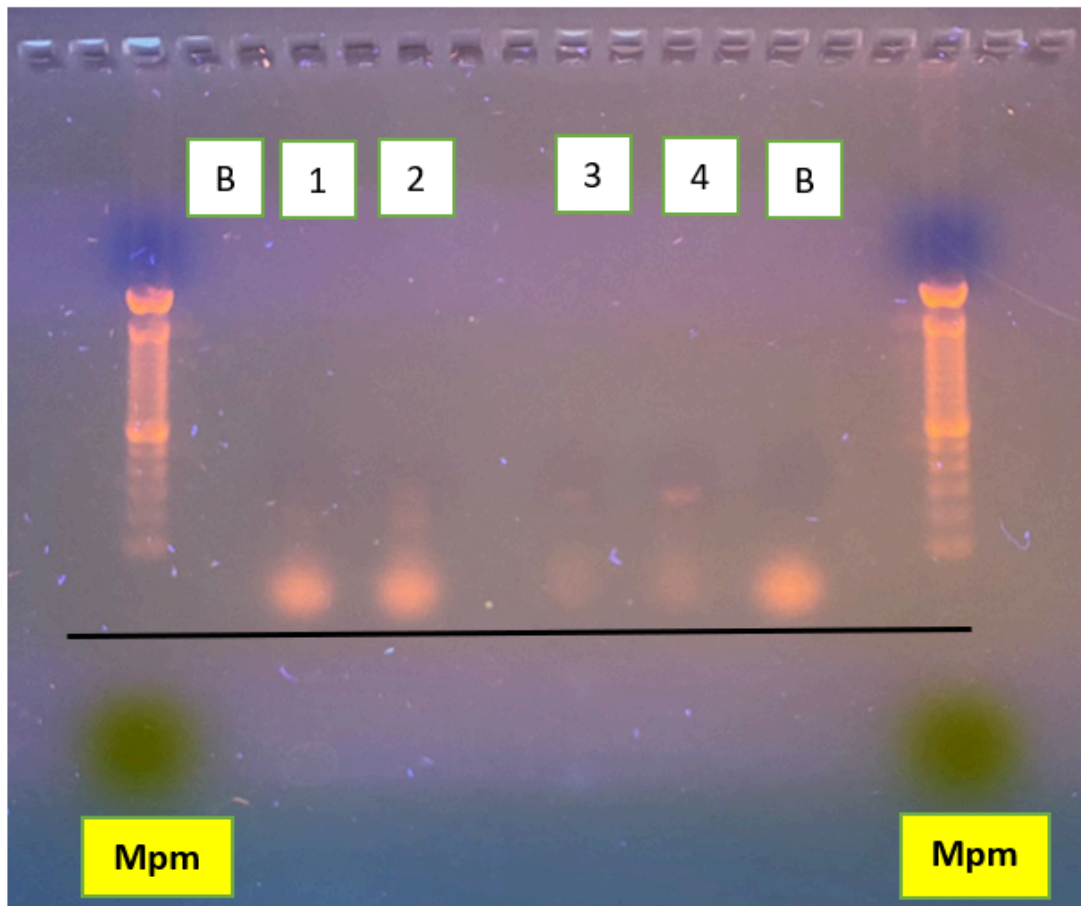
1a, ADN: 1uL. Carril 4: muestra 1a, ADN: 0,5 uL. Carril Mpm: Marcador de peso molecular. Carril 1 y 2 primers/cebadores F1/R1. Carril 3 y 4 primers/cebadores F4/R4.



En el protocolo cinco se decidió cambiar únicamente la concentración de los primers/cebadores utilizando los pares R1/F1 Y R4/F4, pasando de una concentración de 50 % utilizado en el protocolo anterior a 100 %, además se conservó la temperatura a 58 °C con 35 ciclos, se corrió cada muestra por duplicado cómo se puede observar en la figura 18. En este protocolo se comprobó de manera irrefutable la autocomplementariedad y la inespecificidad de los primers/cebadores para el segmento de interés.

Figura 18.

Gel de electroforesis en el quinto protocolo (concentración de agarosa 1,2%). Carri B: Control negativo. Carril 1: muestra 1a. Carril 2: muestra 1a,. Carril 3: muestra 1a. Carril 4: muestra 1a, Mpm: Marcador de peso molecular. Carril 1 y 2 primers/cebadores F4/R4. Carril 3 y 4 primers/cebadores F1/R1.



Después de establecer cinco protocolos, se determinó que los primers utilizados no lograron amplificar el segmento rs429358. La causa principal fue la autocomplementariedad y la inespecificidad de los pares de primers F1/R1 y F4/R4. A pesar de las modificaciones realizadas en diversas condiciones de la PCR, tales como la temperatura de hibridación, las rampas de temperatura, el número de ciclos y las concentraciones de ADN y primers, no se logró obtener el amplicón. Otros factores que pudieron haber influido en el resultado incluyen el uso de agua bidestilada en lugar de agua ultrapura para la reconstitución de los primers, ya que el agua bidestilada puede ser una fuente de contaminación e interferencias. Además, se recomienda experimentar con un rango de temperaturas de hibridación, tanto superiores como inferiores a la temperatura media recomendada, en lugar de confiar únicamente en la temperatura media sugerida en los protocolos de los primers.

A lo largo del proceso, se adquirió un profundo entendimiento de los principios fundamentales de la PCR y se desarrolló la habilidad para diseñar y optimizar primers, aunque se encontraron problemas

de inespecificidad que impidieron la amplificación del segmento de interés. A pesar de ello, se implementó la técnica de PCR, ajustando parámetros clave como la temperatura de hibridación, el número de ciclos y las concentraciones de ADN y primers, lo que permitió mejorar la precisión y el control de los experimentos.

4.2 Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio revelaron que los primers F1/R1 y F4/R4 no lograron amplificar el segmento rs429358, lo que puede atribuirse a su autocomplementariedad e inespecificidad. A pesar de realizar cinco protocolos y modificar diversas condiciones de PCR, como la temperatura de hibridación y la concentración de reactivos, el amplicón esperado no se obtuvo. Este fenómeno sugiere la existencia de otros factores que podrían estar afectando la amplificación, como el uso de agua bidestilada en la reconstitución de los primers, que puede haber introducido contaminantes en la reacción. La calidad del agua es a menudo subestimada, pero puede impactar significativamente la eficacia de la PCR; por ello, se recomienda utilizar agua ultrapura en futuros experimentos. Además, es crucial seleccionar primers que sean específicos y que eviten interacciones no deseadas. Para optimizar la amplificación, sería beneficioso explorar un rango más amplio de temperaturas de hibridación, tanto superiores como inferiores a las recomendaciones estándar, para identificar condiciones más favorables.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica fundamental en la biología molecular, pero su eficiencia puede variar significativamente dependiendo de los parámetros que se estén usando. Según Calero et al (2009), existen diferentes métodos de PCR utilizados en la actualidad, específicamente para amplificar fragmentos polimórficos de la APOE se usa con frecuencia el método PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism-PCR), sin embargo este y otros métodos tienen altos costos y son propensos a errores cuando los parámetros tienen una mínima variación, otros métodos menos utilizados como el PCR-SSP (Simple sequence specific primer-PCR), ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-PCR) pueden ser altamente sensibles y de menor costo no obstante tiene limitaciones dado a que se necesita una verificación en gel de agarosa por electroforesis y el escaso número de muestra analizadas por corrida. El presente estudio utiliza PCR punto final con el fin de obtener el amplicón a bajo costo para que en posteriores estudios pueda ser utilizado como método predictor de la enfermedad para la población,

considerando que los países en vías de desarrollo como el Ecuador la incidencia de casos de EA es mayor.

Por otro lado estudios realizados en Irán por Najd et al (2023), cuyo objetivo principal es detectar el polimorfismo rs429358 y el rs7412 segmentos implicados en los polimorfismos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ donde se analizaron 164 pacientes a las cuales previamente se realizó una genotipificación de los polimorfismos. Se sintetizaron los primers/cebadores en el Software Gen Runner comprobando la especificidad en la plataforma BLAST de la NCBI como se describe en la tabla 14. Entre los descubrimientos llevados a cabo en la investigación se determina que usando ADN polimerasa HiFid se generaba una mejor amplificación del polimorfismo a 25 ciclos, la eficiencia del proceso se la atribuyó a la Taq polimerasa que contiene el reactivo HiFid, finalmente la verificación del amplicón se realizó en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el estudio demostró que los resultados fueron estadísticamente representativos (valor $p < 0,001$). En general, hubo una consistencia del 91 % y 100 % entre sus métodos optimizados de PCR Tetra-ARMS con RFLP y de tipificación de chip, respectivamente, en el reconocimiento de los genotipos de interés. En la Tabla 14 se presentan los primers diseñados en el estudio de Najd et al. (2023), quienes elaboraron tres pares diferentes de primers utilizando la técnica de PCR Tetra-ARMS (Amplificación Refractaria de Múltiples Alelos), una metodología empleada para la detección de polimorfismos genéticos, como mutaciones puntuales, SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), y alelos específicos (Medrano RF & de Oliveira CA, 2014)., como es el caso del APOE. Estos difieren de nuestros cebadores, ya que en nuestro estudio se diseñaron dos pares de primers (empleando un par a la vez) para abarcar ambos SNPs en los codones 112 y 158 lo que nos permite obtener fragmentos más grandes pero menos específicos de cada mutación.

Tabla 13.

Secuencia de los cebadores utilizados en estudio publicado por (Najd et al., 2023).

Nombre	Secuencia 5'-3'	pb	Tem °C
Comun OF	ACTGACCCCGGTGGCGGAGGA	21	69,2
Común OR	CAGGCGTATCTGCTGGGCCTGCTC	24	72,1
rs429358-IR1	GCGGTACTGCACCAGGCGGCCTCA	24	73,8

rs429358-IF1	GGCGCGGACATGGAGGACGGGC	22	73,3
rs7412-IR2	CCCGGCCTGGTACACTGCCAGTCA	24	72,1
rs7412-IF2	CGATGCCGATGACCTGCAGACGC	23	70

En este trabajo de integración curricular se diseñó los primers/cebadores en la página NCBI y se realizó un PCR punto final, a diferencia del estudio comparativo utilizamos “PCR Supermix”, al utilizar la ADN polimerasa sin la combinación de polimerasa Taq y pfu es posible que la amplificación/elongación de la cadena por la actividad reducida de la polimerasa no se de con la eficiencia necesaria, considerando que en este estudio aumentamos los ciclos hasta llegar a 40 a comparación del estudio citado que utilizó 25 ciclos y se verificó un amplicón.

En otro estudio realizado por Kapur et al (2006), se realizó una genotipificación a 20 pacientes con diagnóstico de EA mediante la técnica de PCR-RFLP utilizando un conjunto de cebadores y enzimas de restricción. Los cebadores utilizados fueron 1F 5' GCG GAC ATG GAG GAC GTG 3' y 2R 5' CCA CAC TCA CAG TTT TCT CTT 3', que producen un producto de PCR de 177 pb. Los parámetros de ciclado de PCR consistieron en una incubación inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C (30 s), alineación a 55°C (30 s) y elongación a 72°C (30 s). La PCR se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler, en un volumen final de 20 µl, 2.0 µl (0.1 µg/µl) de ADN genómico, 1.6 µl de cada dNTP (2.5 mM), 0.5 µl de cada uno de los dos cebadores (10 µM), y 1.2 µl de DMSO. El producto de PCR fue digerido con 10 U de la enzima de restricción Hin 61 a 37°C durante 2 horas. Los productos de PCR digeridos y no digeridos se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12% en 1X de tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) utilizando una unidad de electroforesis en gel vertical. El análisis de restricción del producto de PCR de 177 pb produce tres fragmentos de 92 pb, 67 pb y 18 pb en el caso del genotipo Apoε2/2; 92 pb, 48 pb, 19 pb y 18 pb en el caso del genotipo Apoε3/3; y 72 pb, 48 pb, 20 pb, 19 pb y 18 pb en el caso del genotipo Apoε4/4. Así, la presencia o ausencia de bandas de 67 pb, 48 pb y 72 pb distingue los alelos Apoε2, Apoε3 y Apoε4.

En nuestro trabajo por otra parte la incubación inicial fue de 4 minutos en lugar de 5, la desnaturalización la realizamos a temperaturas muy cercanas pero a la mitad del tiempo que en este artículo (15 s). Se utilizó “PCR Supermix” en lugar de los componentes individuales y realizamos la electroforesis en gel de Agarosa al 1.2% en lugar de Poliacrilamida, no se empleó enzimas de

restricción ya que nuestro propósito es la estandarización del método de PCR más no la genotipificación; a relación al estudio publicado por Kapur et al (2006) las enzimas de restricción aportan mejores condiciones para amplificar el segmento polimórfico de la APOE4.

En un análisis de casos y controles realizado por Pourshaikhali et al (2022), se examinaron 90 pacientes con Alzheimer como grupo de casos y 90 individuos sanos como grupo de control. La genotipificación de APOE se llevó a cabo mediante técnicas de HRM y PCR Multiplex T-ARMS. Se diseñaron los primers utilizando las herramientas en línea Primer3, la herramienta de diseño de primers blast de NCBI y las herramientas offline Oligo del software Gene Runner. Se menciona además que la longitud apropiada del amplicón para los primers de genotipificación de polimorfismos de nucleótido único (SNP) mediante HRM es de aproximadamente 100 bp. Por lo tanto, los primers para los dos loci rs429358 y rs7412 se diseñaron por separado. Los primers amplifican 118 y 94 bp para detectar los alelos rs7412 y rs429358, respectivamente. Los primers utilizados para el estudio en el caso de la PCR T-ARMS Multiplex fueron seleccionados de trabajos anteriores, por otro lado se diseñaron primers que amplifican 719 pb del gen APOE que engloba ambos SNPs (Tabla 15).

Para la HRM se realizó PCR en tiempo real. Para la PCR T-ARMS múltiple la reacción de PCR se realizó con el termociclador C1000 Touch (BioRad). Cada microtubo contenía en un volumen total de 31.45 µl con 40 ng de ADN polimerasa, 0.25 unidades de HotStarT taq ADN polimerasa, 6% DMSO, 1 mM de MgCl₂, 15 pmol de cada uno de los cebadores (FO, RO, FI-1, RI-1, FI-2, RI-2), 2.5 µl de buffer AMS, 0.5 µl de DNTP, 0.5 µl de BSA y agua suficiente. El programa de Multiplex T-ARMS PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 min, seguido de 25 ciclos a 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 2 min, seguido de 72 °C durante 5 min. Los productos de la PCR se diferenciaron en gel de agarosa al 2% y se tiñeron con un tinte de Invitrogen. La secuenciación se envió a un laboratorio de Corea para confirmar los resultados de la genotipificación (Pourshaikhali, et al., 2022).

Durante nuestro diseño experimental logramos diseñar dos pares de primers que abarcan ambos loci rs429358 y rs7412 con tamaños de 435 a 439 pb (R1,F1 y R4,F4 respectivamente) (tabla 12). Sin embargo, a pesar de que el tamaño del amplicón es relativamente grande no explicaría el hecho de que no se haya podido amplificar ya que Pourshaikhali, et al (2022), diseñó primers que abarcan ambos SNPs con un tamaño mayor de pb, específicamente de 719 pb para la secuenciación..

Otros motivos por los cuales no se haya podido amplificar puede ser el % de GC que es de 55.56 % y 54.95% para F1 y R1 respectivamente y de 52.63% y 64.71% para F4, R4 los cuales son altos dado que lo recomendable es que sean inferiores al 50%. La autocomplementariedad es baja siendo de 2 para todos los primers sin embargo la especificidad puede haber constituido el impedimento para que exista una amplificación adecuada ya que durante el diseño se observó que existía la posibilidad de que se uniera a otros fragmentos del ADN cercanos a 100 pb.

Tabla 14.

Secuencia de los cebadores utilizados en estudio publicado por (Pourshaikhali, et al., 2022).

Usado para	Aplicación	Primer s	secuencia de Primers
HRM	rs7412 (118 pb)	F R	5'-CGATGCCGATGACCTGCAGA-3' 5'- GCGGCCCTGTTCCACCA-3'
	rs429358 (94 pb)	F R	5'- GGCACGGCTGTCCAAGGAG-3' 5'- CTCGCCGCGGTACTGCAC-3'
PCR T-ARMS múltiple	Cebadores externos comunes	FO RO	5'-ACTGACCCCGGTGGCGGAGGA-3' 5'-CAGGCGTATCTGCTGGGCCTGCTC-3'
	Cebadores internos en rs429358	FI-1 RI-1	5'GGCGCGGACATGGAGGACGgGC-3' 5'-GCGGTACTGCACCAGGCGGCCTCA-3'
	Cebadores internos en rs7412	FI-2 RI-2	5'-CGATGCCGATGACCTGCAGAcGC-3' 5'-CCCGGCCTGGTACACTGCCAGtCA-3'
PCR-DNA secuenciación	Ambos SNPs (719 pb)	F R	5'-GGACGAGACCATGAAGGAGTT-3' 5'-GCTTCGGCGTTCAGTGATTGT-3'

Capítulo V

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se logró identificar in silico la secuencia del segmento rs429358 del polimorfismo Apo ϵ 4, lo cual es crucial para entender su rol en la patología de la enfermedad de Alzheimer y durante la realización de esta tesis se decidió agregar el polimorfismo rs7412 ya que nos permitiría identificar el resto de alelos homocigotos (ϵ 2/ ϵ 2, ϵ 3/ ϵ 3, ϵ 4/ ϵ 4) y heterocigotos (ϵ 2/ ϵ 3, ϵ 2/ ϵ 4, ϵ 3/ ϵ 4) ya que si bien tener una o dos copias del alelo ϵ 4 aumenta la susceptibilidad, tener el alelo ϵ 2 tienen un efecto protector frente a la EA de inicio tardío. Este paso permitió avanzar en el conocimiento específico de la secuencia objetivo y su relevancia en el contexto de la enfermedad.

Los primers diseñados y sintetizados resultaron ser específicos in silico sin embargo en la marcha experimental in situ no se pudo obtener amplicones del segmento rs429358 debido en parte a la autocomplementariedad de los cebadores y a la inespecificidad de los mismos. Este inconveniente puede deberse a varios factores, como la alta similitud de la secuencia con otras secuencias en la base de datos, la presencia de estructuras secundarias complejas, la autocomplementariedad de los primers o limitaciones técnicas en el proceso de diseño de cebadores.

En el diseño experimental se usó PCR punto final una técnica cualitativa o semicuantitativa para amplificar el segmento de interés, sin embargo presenta limitaciones las cuales pueden disminuir si usamos PCR en tiempo real u otros tipos de PCR con el fin de tener mayor precisión en la amplificación del segmento de interés en el estudio.

Se evaluó la amplificación del amplicón mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y se evidenció que no proporcionó las bandas específicas esperadas, lo que confirma que los cebadores diseñados no eran adecuados para la amplificación del segmento rs429358. Esta etapa puso en evidencia la necesidad de revisar y mejorar el diseño de los cebadores para futuros intentos de amplificación.

5.2 Recomendaciones

Utilizar herramientas de diseño de cebadores más avanzadas y actualizadas o realizar pruebas cruzadas entre plataformas para poder considerar la optimización de parámetros como la temperatura, la longitud del cebador y la ausencia de estructuras secundarias.

Se debe considerar el uso de técnicas complementarias (de soporte) como la PCR en tiempo real (qPCR) o la PCR digital (dPCR) que puedan proporcionar mayor sensibilidad y especificidad en la detección del segmento rs429358.

Usar agua ultrapura para diluir los primers/cebadores.

Llevar a cabo ensayos de controles positivos utilizando secuencias conocidas para validar la eficacia de los nuevos cebadores antes de aplicarlos a muestras experimentales.

Utilizar enzimas de restricción ya que permite identificar los polimorfismos y mejorar los amplicones en cada corrida.

Referencias

- Andrade-Guerrero, J., Santiago-Balmaseda, A., Jeronimo-Aguilar, P., Vargas-Rodríguez, I., Cadena-Suárez, A. R., Sánchez-Garibay, C., Pozo-Molina, G., Méndez-Catalá, C. F., Cardenas-Aguayo, M.-C., Diaz-Cintra, S., Pacheco-Herrero, M., Luna-Muñoz, J., & Soto-Rojas, L. O. (2023). Alzheimer 's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijms24043754>
- Atis, O., Sahin, S., Ceyhan, K., Ozyurt, H., Akbas, A., & Benli, I. (2016). The Distribution of Apolipoprotein E Gene Polymorphism and Apolipoprotein E Levels among Coronary Artery Patients Compared to Controls. *The Eurasian Journal of Medicine*, 48(2), 90-94. <https://doi.org/doi: 10.5152/eurasianjmed.2015.25>
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics*, 103(2), 263-293. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
- Bhat, A. I., & Rao, G. P. (2020). Polymerase Chain Reaction. En A. I. Bhat & G. P. Rao (Eds.), *Characterization of Plant Viruses: Methods and Protocols* (pp. 323-345). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0334-5_35
- Blennow, K., & Zetterberg, H. (2015). Understanding Biomarkers of Neurodegeneration: Ultrasensitive detection techniques pave the way for mechanistic understanding. *Nature Medicine*, 21(3), 217-219. <https://www.nature.com/articles/nm.3810>.
- Blumenfeld, J., Yip, O., Joo, M., Huang, Y. (2024). Cell type-specific roles of APOE4 in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 25(2). DOI.10.1038/s41583-023-00776-9
- Butler, M., Nelson, V. A., Davila, H., Ratner, E., Fink, H. A., Hemmy, L. S., McCarten, J. R., Barclay, T. R., Brasure, M., & Kane, R. L. (2018). Over-the-Counter Supplement Interventions to Prevent Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, and Clinical Alzheimer-Type Dementia: A Systematic Review. *Annals of Internal Medicine*, 168(1), 52-62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29255909/>
- Caffò, A. O., Spano, G., Tinella, L., Lopez, A., Ricciardi, E., Stasolla, F., & Bosco, A. (2022). The Prevalence of Amnestic and Non-Amnestic Mild Cognitive Impairment and Its Association with Different Lifestyle Factors in a South Italian Elderly Population. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijerph19053097>

- Calero, O., Hortigüela, R., Bullido, M., y Calero, M. (2009). Método de genotipificado de la Apolipoproteína E mediante PCR en tiempo real, una alternativa rápida y rentable a los ensayos TaqMan y FRET. *Revista de Métodos Neurocientíficos*, 183. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.06.033.
- Chau, A., Yan, C., Li, A., & Wong, S. (2022). Kit de detección no invasivo para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. *Divulgación de la invención*, 2. ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/j.inv.2022.100004>
- Chauhan, K., Singh, A. R., Kumar, S., & Granek, R. (2022). Can one detect intermediate denaturation states of DNA sequences by following the equilibrium open–close dynamic fluctuations of a single base pair? *The Journal of Chemical Physics*, 156(16), 164907. <https://doi.org/10.1063/5.0088109>
- Cruchaga, C., Kauwe, J. S. K., Harari, O., Jin, S. C., Cai, Y., Karch, C. M., Benitez, B. A., Jeng, A. T., Skorupa, T., Carrell, D., Bertelsen, S., Bailey, M., McKean, D., Shulman, J. M., De Jager, P. L., Chibnik, L., Bennett, D. A., Arnold, S. E., Harold, D., ... Goate, A. M. (2013). GWAS of Cerebrospinal Fluid Tau Levels Identifies Risk Variants for Alzheimer's Disease. *Neuron*, 78(2), 256-268. [https://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273\(13\)00184-0.pdf](https://www.cell.com/neuron/pdf/S0896-6273(13)00184-0.pdf)
- Cruz, P. M., Wood, M. A., Abbasi, R., LeFevre, T. B., & McCalla, S. E. (2021). An inexpensive, versatile, compact, programmable temperature controller and thermocycler for simultaneous analysis and visualization within a microscope. *Microfluidics and Nanofluidics*, 25(5), 40. <https://doi.org/10.1007/s10404-021-02440-z>
- Defagó, M., & Eynard, A. (2022). Nutrigenetics: Potentials and applications in cardiovascular diseases and associated risk factors. *Revista de La Facultad de Ciencias Medicas*, 79(2), 168-180. <https://doi.org/DOI: 10.31053/1853.0605.v79.n2.30289>
- Dehghani, N., Bras, J., & Guerreiro, R. (2021). How understudied populations have contributed to our understanding of Alzheimer's disease genetics. *Brain*, 144(4), 1067-1081. <https://doi.org/10.1093/brain/awab028>
- Esiobu, N. (Diuto), Ezeonu, I. M., & Nwaokorie, F. (2021). Principles and Techniques for Deoxyribonucleic Acid (DNA) Manipulation. En *Medical Biotechnology, Biopharmaceutics, Forensic Science and Bioinformatics*. CRC Press. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003178903-1/principles-technique>

s-deoxyribonucleic-acid-dna-manipulation-nwadiuto-diuto-esiobu-ifeoma-ezeonu-franciscanwaokorie

- Fiandaca, M. S., Kapogiannis, D., Mapstone, M., Boxer, A., Eitan, E., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Petersen, R. C., Federoff, H. J., Miller, B. L., & Goetzl, E. J. (2015). Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's & Dementia*, 11(6), 600-607.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.06.008>
- Fink, H. A., Jutkowitz, E., McCarten, J. R., Hemmy, L. S., Butler, M., Davila, H., Ratner, E., Calvert, C., Barclay, T. R., Brasure, M., Nelson, V. A., & Kane, R. L. (2018). Pharmacologic Interventions to Prevent Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, and Clinical Alzheimer-Type Dementia: A Systematic Review. *Annals of Internal Medicine*, 168(1), 39-51. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29255847/>
- Foxe, D., Irish, M., Roquet, D., Scharfenberg, A., Bradshaw, N., Hodges, J. R., Burrell, J. R., & Piguet, O. (2020). Visuospatial short-term and working memory disturbance in the primary progressive aphasia: Neuroanatomical and clinical implications. *Cortex*, 132, 223-237. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2020.08.018>
- Golde, T. E., DeKosky, S. T., & Galasko, D. (2018). Alzheimer's disease: The right drug, the right time. *Science* (New York, N.Y.), 362(6420), 1250-1251. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30545877/>
- Henriques, A. D., Benedet, A. L., Camargos, E. F., Rosa-Neto, P., & Nóbrega, O. T. (2018). Fluid and imaging biomarkers for Alzheimer's disease: Where we stand and where to head to. *Experimental Gerontology*, 107, 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.01.002>
- Husain, M. A., Laurent, B., & Plourde, M. (2021). APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.630502>
- Janeiro, M. H., Ardanaz, C. G., Sola-Sevilla, N., Dong, J., Cortés-Erice, M., Solas, M., Puerta, E., & Ramírez, M. J. (2021). Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer. *Advances in Laboratory Medicine / Avances en Medicina de Laboratorio*, 2(1), 39-50. <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0090>
- Junta de Beneficencia de Guayaquil. (2020, September 21). El Alzheimer una enfermedad que no debe quedar en el olvido. Junta de Beneficencia de Guayaquil. Retrieved April 12, 2024,

from

<https://www.juntadebeneficencia.org.ec/prensa/boletines-de-prensa/3634-el-alzheimer-una-enfermedad-que-no-debe-quedar-en-el-olvido>

- Kapur, S., Sharad, S., Kapoor, M., & Bala, K. (2006). ApoE Genotypes: Risk factor for Alzheimer's Disease. Birla Institute of Technology and Sciences (BITS), Pilani, Rajasthan. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/68447901/ApoE_Genotypes__Risk_factor_for_Alzheimer20210731-5757-48kk6f.pdf?1627783134=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DApoE_genotypes_risk_factor_for_Alzheimer.pdf&Expires=1720319444&Signature=KRbxmMj9
- Khan Academy. (2018). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (artículo). Khan Academy. <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., Nixon, R. A., & Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 1-21. <https://www.nature.com/articles/s41572-021-00269-y>
- Knopman, D. S., Jack, C. R., Lundt, E. S., Weigand, S. D., Vemuri, P., Lowe, V. J., Kantarci, K., Gunter, J. L., Senjem, M. L., Mielke, M. M., Machulda, M. M., Roberts, R. O., Boeve, B. F., Jones, D. T., & Petersen, R. C. (2016). Evolution of neurodegeneration-imaging biomarkers from clinically normal to dementia in the Alzheimer disease spectrum. *Neurobiology of Aging*, 46, 32-42. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27460147/>
- Li, J.-Q., Yuan, X.-Z., Li, H.-Y., Cao, X.-P., Yu, J.-T., Tan, L., Chen, W.-A., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2018). Genome-wide association study identifies two loci influencing plasma neurofilament light levels. *BMC Medical Genomics*, 11(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0364-8>
- Li, Z., Shue, F., Zhao, N., Shinohara, M., & Bu, G. (2020). APOE2: Protective mechanism and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00413-4>
- Liang, Z., Wu, Y., Li, C., & Liu, Z. (2023). Clinical and genetic characteristics in a central-southern Chinese cohort of early-onset Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology*, 14(26), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1119326>

- Lim, K.-H., Kim, S.-H., Yang, S., Chun, S., & Joo, J.-Y. (2021). Advances in multiplex PCR for Alzheimer's disease diagnostics targeting CDK genes. *Neuroscience Letters*, 749, 135715. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135715>
- Lodato, M. A., Rodin, R. E., Bohrsen, C. L., Coulter, M. E., Barton, A. R., Kwon, M., Sherman, M. A., Vitzthum, C. M., Luquette, L. J., Yandava, C. N., Yang, P., Chittenden, T. W., Hatem, N. E., Ryu, S. C., Woodworth, M. B., Park, P. J., & Walsh, C. A. (2018). Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science*, 359(6375), 555-559. <https://doi.org/DOI: 10.1126/science.aao4426>
- Lord, J., Zettergren, A., Ashton, N. J., Karikari, T. K., Benedet, A. L., Simrén, J., Hye, A., Aarsland, D., Blennow, K., Zetterberg, H., & Proitsi, P. (2021). A genome-wide association study of plasma phosphorylated Tau181. *Neurobiology of Aging*, 106, 304.e1-304.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.04.018>
- Lotha, G. (2024). Polymerase chain reaction (PCR) Definition & Steps. *Britannica*. <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>
- Lumsden AL, Mulugeta A, Zhou A, Hyppönen E. (2020). Apolipoprotein E (APOE) genotype-associated disease risks: a phenome-wide, registrybased, case-control study utilising the UK Biobank. *EBioMedicine*. 2020;59:102954. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102954>.
- Magdalinou, N. K., Paterson, R. W., Schott, J. M., Fox, N. C., Mummery, C., Blennow, K., Bhatia, K., Morris, H. R., Giunti, P., Warner, T. T., Silva, R. de, Lees, A. J., & Zetterberg, H. (2015). A panel of nine cerebrospinal fluid biomarkers may identify patients with atypical parkinsonian syndromes. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 86(11), 1240-1247. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-309562>
- Martínez-Martínez AB, Torres-Perez E, Devanney N, Del Moral R, Johnson LA, Arbones-Mainar JM.(2020). Beyond the CNS: The many peripheral roles of APOE. *Neurobiol Dis*. 2020;138:104809. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104809>.
- Mateo, E. d. T., Moreno, M., Álvarez, S., & Sánchez, J. (2023). Estudio molecular de los polimorfismos comunes del gen apoE asociados con disbetalipoproteinemia familiar y la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Ministerio de Sanidad. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS). https://www.iacs.es/wp-content/uploads/2023/12/I43-IACS_Gen-ApoE_DEF.pdf

- Mattsson, N., Andreasson, U., Zetterberg, H., Blennow, K., & for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2017). Association of Plasma Neurofilament Light With Neurodegeneration in Patients With Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 74(5), 557-566. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.6117>
- Martínez-Martínez AB, Torres-Perez E, Devanney N, Del Moral R, Johnson LA, Arbones-Mainar JM. Beyond the CNS: The many peripheral roles of APOE. *Neurobiol Dis*. 2020;138:104809. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104809>.
- Medrano RF, de Oliveira CA.(2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol Biotechnol*. 56(7):599-608. doi: 10.1007/s12033-014-9734-4. PMID: 24519268.
- Mejia, J., Mero, L., Apolinario, J., & Guillen, M. (2021). Relación entre alteraciones cognitivas y depresión en pacientes con alzhéimer en Ecuador. *Revista científica INSPILIP*, 5(2). 10.31790/inspilip.v5i2.29
- Miller, M. B., Reed, H. C., & Walsh, C. A. (2021). Brain Somatic Mutation in Aging and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 22(Volume 22, 2021), 239-256. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-121520-081242>
- Nabers, A., Perna, L., Lange, J., Mons, U., Schartner, J., Guldénhaupt, J., Saum, K., Janelidze, S., Holleccek, B., Rujescu, D., Hansson, O., Gerwert, K., & Brenner, H. (2018). Amyloid blood biomarker detects Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 10(5), e8763. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708763>
- Najd, L., Hedayati, M., Shahzadeh, S., Deneshpour, M. (2013). Un método optimizado de genotipificación basado en PCR para detectar polimorfismo humanos de APOE. *Heliyon*, 9. Tehran, PO Box:19195-4763, Irán.
- Najd-Hassan-Bonab, L., Hedayati, M., Shahzadeh Fazeli, S. A., & Daneshpour, M. S. (2023). An optimized method for PCR-based genotyping to detect human APOE polymorphisms. *Heliyon*, 9(11), e21102. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21102>
- Ohara, T., Hata, J., Yoshida, D., Mukai, N., Nagata, M., Iwaki, T., Kitazono, T., Kanba, S., Kiyohara, Y., & Ninomiya, T. (2017). Trends in dementia prevalence, incidence, and survival rate in a Japanese community. *Neurology*, 88(20), 1925-1932. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003932>

- Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., Hölttä, M., Rosén, C., Olsson, C., Strobel, G., Wu, E., Dakin, K., Petzold, M., Blennow, K., & Zetterberg, H. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 15(7), 673-684. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00070-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00070-3)
- OMS. (2023, Marzo 15). Demencia. Organización Mundial de la Salud. Retrieved 2024, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- OPS. (2023). Demencia. OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. Retrieved April 12, 2024, from <https://www.paho.org/es/temas/demencia>
- Ovod, V., Ramsey, K. N., Mawuenyega, K. G., Bollinger, J. G., Hicks, T., Schneider, T., Sullivan, M., Paumier, K., Holtzman, D. M., Morris, J. C., Benzinger, T., Fagan, A. M., Patterson, B. W., & Bateman, R. J. (2017). Amyloid β concentrations and stable isotope labeling kinetics of human plasma specific to central nervous system amyloidosis. *Alzheimer's & Dementia*, 13(8), 841-849. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.06.2266>
- Palmer, N. D., Kahali, B., Kuppaa, A., Chen, Y., Du, X., Feitosa, M. F., Bielak, L. F., O'Connell, J. R., Musani, S. K., Guo, X., Smith, A. V., Ryan, K. A., Eirksdottir, G., Allison, M. A., Bowden, D. W., Budoff, M. J., Carr, J. J., Chen, Y.-D. I., Taylor, K. D., ... Speliotes, E. K. (2021). Allele-specific variation at APOE increases nonalcoholic fatty liver disease and obesity but decreases risk of Alzheimer's disease and myocardial infarction. *Human Molecular Genetics*, 30(15), 1443-1456. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab096>
- Patterson, C. (2018). World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: New frontiers. *Alzheimer's Disease International*. <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2018/>
- Paschalidi, M., Roma, T., Sanz, S., Bertini, C. (2023). Trends in mortality from Alzheimer's disease in Brazil, 2000-2019. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 32(2). DOI. 10.1590/S2237-96222023000200002.
- Pérez, A. (2018). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). Universidad Politecnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>

- Pérez-Grijalba, V., Fandos, N., Canudas, J., Insua, D., Casabona, D., Lacosta, A. M., Montañés, M., Pesini, P., & Sarasa, M. (2016). Validation of Immunoassay-Based Tools for the Comprehensive Quantification of A β 40 and A β 42 Peptides in Plasma. *Journal of Alzheimer's Disease*, 54(2), 751-762. <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad160325>
- Plantone D, Pardini M, Righi D, Manco C, Colombo BM, De Stefano N. (2023). The Role of TNF- α in Alzheimer's Disease: A Narrative Review. *Cells*;13(1):54. doi: 10.3390/cells13010054. PMID: 38201258; PMCID: PMC10778385.
- Pourshaikhali, S., Saleh-Gohari, N., Saeidi, K., & Fekri Soofiabadi, M. (2022). Multiplex-Tetra ARMS PCR Versus High-Resolution Melting Analysis Assay Method for Characterization of Apolipoprotein E Genotype in Alzheimer Patients: A Case-Control Study. *Basic and Clinical Neuroscience*. Doi: <http://dx.doi.org/10.32598/bcn.2022.206.2>
- Robinson, R. A. S., Amin, B., & Guest, P. C. (2017). Multiplexing Biomarker Methods, Proteomics and Considerations for Alzheimer's Disease. En P. C. Guest (Ed.), *Proteomic Methods in Neuropsychiatric Research* (pp. 21-48). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52479-5_2
- Robledo, L., Rojas, A., Gutiérrez, H., Ortuño, D., Pallàs, M., Beas, C., & Camins, A. (2011). *Tópicos de actualización en neurobiología Envejecimiento y Neurodegeneración*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/814365/neurodegeneracion.pdf>
- Rozendo, F. C. (2023). Identificação de polimorfismos no gene Apoe em pessoas idosas com queixas Cognitivas da cidade de São Carlos, SP- Brasil [Tesis de pregrado, Universidad Federal De São Carlos]. https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/17630/FERNANDA_CAROLINA_ROZENDO%20DISSERTA%C3%87%C3%83O_2023%20.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Safieh, M., Korczyn, A., & Michaelson, D. (2019, Marzo 7). ApoE4: una diana terapéutica emergente para la enfermedad de Alzheimer. *Medicina BMC*, 17(64). <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-019-1299-4>

- Saghatelyan, A., Panosyan, H., Trchounian, A., & Birkeland, N.-K. (2021). Characteristics of DNA polymerase I from an extreme thermophile, *Thermus scotoductus* strain K1. *MicrobiologyOpen*, 10(1), e1149. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1149>
- Sarmiento, A. (2014). Genotipificación del gen de la apolipoproteína e Mediante PCR convencional en pacientes con Diagnóstico presuntivo de la enfermedad de Alzheimer, atendidos en instituciones geriátricas de La ciudad de quito, de mayo a diciembre del 2012 [Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <https://repositorio.puce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/77f9edcd-c185-463b-afa7-40566b69423f/content>
- Souza, E., Santos, A., & Silva, A. (2021). Doença de Alzheimer. Abordagem sobre a Fisiopatologia. *Espisteme Transversalis*, Volta Redonda, 12(2), 356-381. ISSN 2236-2649
- Stevenson-Hoare, J., Heslegrave, A., Leonenko, G., Fathalla, D., Bellou, E., Luckcuck, L., Marshall, R., Sims, R., Morgan, B. P., Hardy, J., de Strooper, B., Williams, J., Zetterberg, H., & Escott-Price, V. (2023). Plasma biomarkers and genetics in the diagnosis and prediction of Alzheimer's disease. *Brain*, 146(2), 690-699. <https://doi.org/10.1093/brain/awac128>
- Suárez-Calvet, M., Kleinberger, G., Araque Caballero, M. Á., Brendel, M., Rominger, A., Alcolea, D., Fortea, J., Lleó, A., Blesa, R., Gispert, J. D., Sánchez-Valle, R., Antonell, A., Rami, L., Molinuevo, J. L., Brosseron, F., Trschütz, A., Heneka, M. T., Struyfs, H., Engelborghs, S., ... Haass, C. (2016). sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers. *EMBO Molecular Medicine*, 8(5), 466-476. <https://doi.org/10.15252/emmm.201506123>
- Tahami, A. A., Byrnes, M. J., White, L. A., & Zhang, Q. (2022). Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression. *Neurology and Therapy*, 11(2), 553-569. <https://doi.org/10.1007/s40120-022-00338-8>
- Tayyeb, A., & Basit, Z. (2023). Polymerase Chain Reaction. En *Genetic Engineering*. Apple Academic Press. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003378266-6/polymerase-chain-reaction-asima-tayyeb-zhuha-basit>
- Tricco, A. C., Thomas, S. M., Veroniki, A. A., Hamid, J. S., Cogo, E., Strifler, L., Khan, P. A., Robson, R., Sibley, K. M., MacDonald, H., Riva, J. J., Thavorn, K., Wilson, C.,

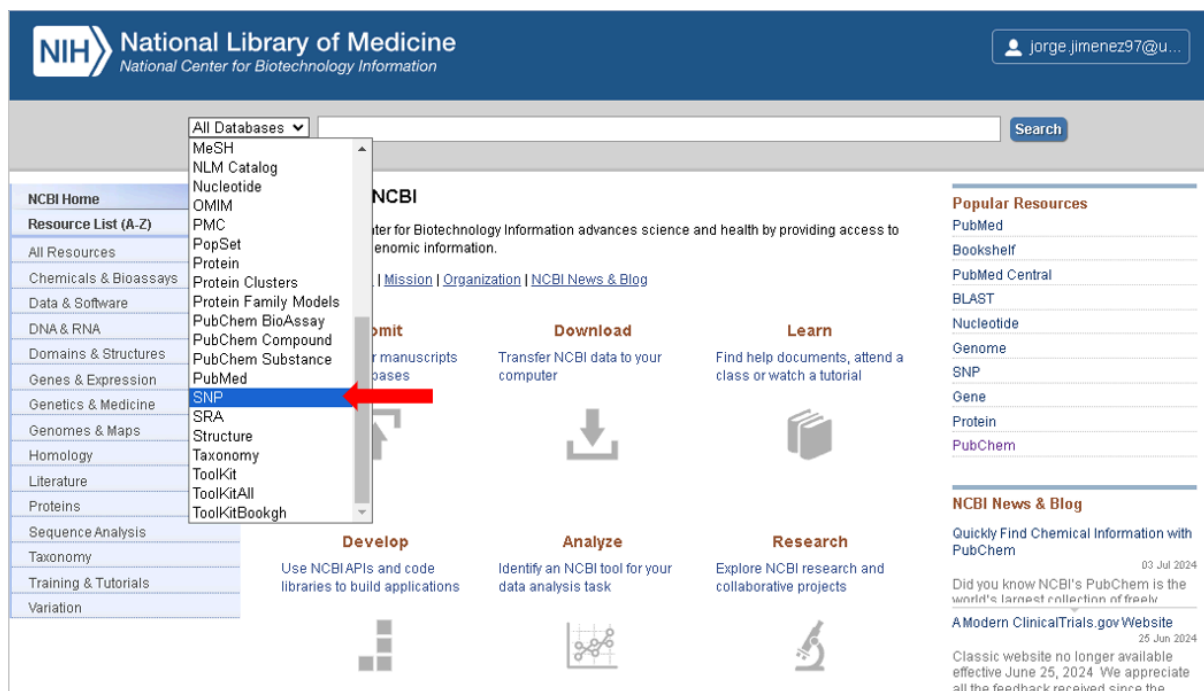
- Holroyd-Leduc, J., Kerr, G. D., Feldman, F., Majumdar, S. R., Jaglal, S. B., Hui, W., & Straus, S. E. (2017). Comparisons of Interventions for Preventing Falls in Older Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*, 318(17), 1687-1699. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29114830/>
- Turvey, M. W., Gabriel, K. N., Lee, W., Taulbee, J. J., Kim, J. K., Chen, S., Lau, C. J., Kattan, R. E., Pham, J. T., Majumdar, S., Garcia, D., Weiss, G. A., & Collins, P. G. (2022). Single-molecule Taq DNA polymerase dynamics. *Science Advances*, 8(10), eabl3522. <https://doi.org/DOI: 10.1126/sciadv.abl3522>
- Urfer, A., & Urfer, R. (2017). Identificación de un motivo de reconocimiento del factor respiratorio nuclear 1 en la variante APOE4 de la apolipoproteína E vinculada a la enfermedad de Alzheimer. *Nature*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep40668>
- Van Oostveen, W. M., & de Lange, E. C. M. (2021). Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ijms22042110>
- Wellington, H., Paterson, R. W., Portelius, E., Törnqvist, U., Magdalinou, N., Fox, N. C., Blennow, K., Schott, J. M., & Zetterberg, H. (2016). Increased CSF neurogranin concentration is specific to Alzheimer disease. *Neurology*, 86(9), 829-835. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002423>
- Williamson, J. D., Pajewski, N. M., Auchus, A. P., Bryan, R. N., Chelune, G., Cheung, A. K., Cleveland, M. L., Coker, L. H., Crowe, M. G., Cushman, W. C., Cutler, J. A., Davatzikos, C., Desiderio, L., Erus, G., Fine, L. J., Gaussoin, S. A., Harris, D., Hsieh, M.-K., Johnson, K. C., ... Wright, C. B. (2019). Effect of Intensive vs Standard Blood Pressure Control on Probable Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 321(6), 553-561. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30688979/>
- Yang, A., Kantor, B., & Chiba-Falek, O. (2021). APOE: The New Frontier in the Development of a Therapeutic Target towards Precision Medicine in Late-Onset Alzheimer's. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms22031244>
- Zurique, C., Cadena, M., Zurique, M., Camacho, P., Sánchez, M., Hernández, S., Velásquez, K., y Ustate, V. (2019). Prevalencia de demencia en adultos mayores de América Latina: revisión sistemática. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. 54(6). pp-346-355. DOI: 10.1016/j.regg.2018.12.007.

- Zhang, X.-X., Tian, Y., Wang, Z.-T., Ma, Y.-H., Tan, L., & Yu, J.-T. (2021). The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 8(3), 313-321. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.15>
- Zhussupova, A. (2022). PCR – diagnostics. Litres.
- Zlokovic, B. V., Gottesman, R. F., Bernstein, K. E., Seshadri, S., McKee, A., Snyder, H., Greenberg, S. M., Yaffe, K., Schaffer, C. B., Yuan, C., Hughes, T. M., Daemen, M. J., Williamson, J. D., González, H. M., Schneider, J., Wellington, C. L., Katusic, Z. S., Stoeckel, L., Koenig, J. I., ... Chen, J. (2020). Vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID): A report from the 2018 National Heart, Lung, and Blood Institute and National Institute of Neurological Disorders and Stroke Workshop. *Alzheimer's & Dementia*, 16(12), 1714-1733. <https://doi.org/10.1002/alz.12157>

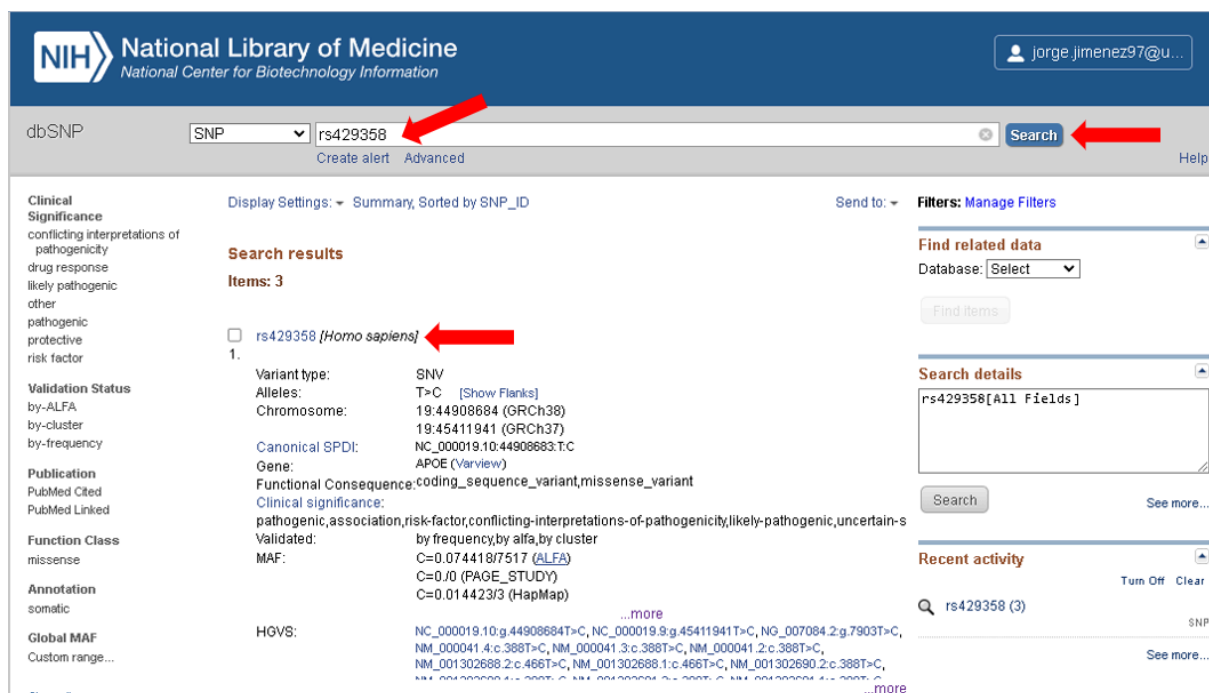
Anexos

Anexo A: Diseño de los primers

- a) En la página del National Center for Biotechnology Medicine (NCBI), cambiar la opción de “All Databases” por “SNP”.



- b) Con la opción “SNP” ingresar el rs429358 y hacer click en “search” y seleccionar la primera opción**



c) Seleccionar la opción de “flanks”.

rs429358

Current Build 156
 Released September 21, 2022

Organism	Homo sapiens	Clinical Significance	Reported in ClinVar
Position	chr19:44908684 (GRCh38.p14)	Gene : Consequence	APOE : MissenseVariant
Alleles	T>C	Publications	484 citations
Variation Type	SNV Single Nucleotide Variation	Genomic View	Seers on genome
Frequency	C=0.155314 (41110/264690, TOPMED) C=0.138498 (23502/169692, GnomAD_exome) C=0.160595 (22490/140042, GnomAD) (+ 19 more)		

Frequency

Variant Details

Clinical Significance

HGVS

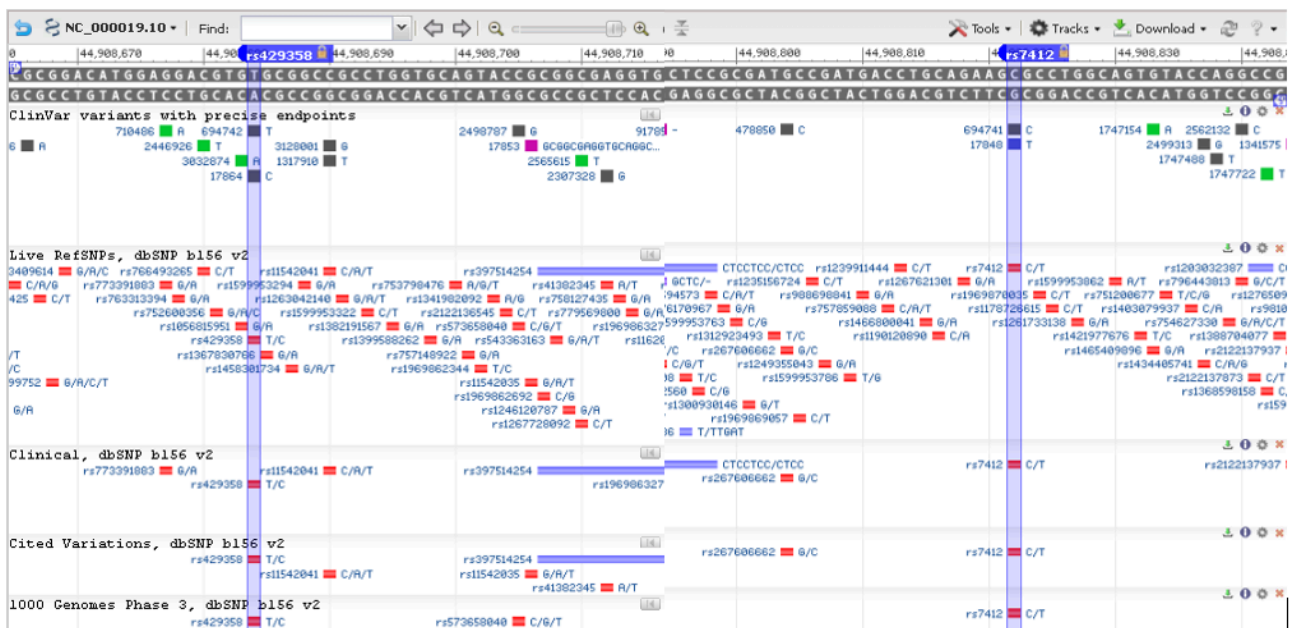
Submissions

History

Publications

Flanks

d) Una vez encontrado el rs429358 identificamos la posición en el gen “Position: 44908684” y también la rs7412 “Position: 44908822”.



e) Elegir la opción “Tools”, “BLAST and Primer Search” y “Primer BLAST” para que imprima el rango observado en la pantalla.

f) En “Primer BLAST” establecer los parámetros recomendados como máximo 500 pb, T_m mínima 50 °C, Óptima 55 °C y Máxima de 60°C y la diferencia en la temperatura máxima entre ambos cebadores de 2°C y seleccionar “Get Primers”.

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primers for target on one template | Primers common for a group of sequences

Retrieve recent results | Publication | Tips for finding specific primers | Save search parameters

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)

Forward primer

Reverse primer

Or, upload FASTA file Ningún archivo seleccionado

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

PCR product size Min Max

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m) Min Opt Max Max T_m difference

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check ☒ Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode

Database

Exclusion ☐ Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) ☐ Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism

Enter query (optional)

Primer specificity stringency Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including at least mismatches within the last bps at the 3' end. Ignore targets that have or more mismatches to the primer.

Max target amplicon size

Allow splice variants ☐ Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input)

☐ Show results in a new window ☒ Use new graphic view

g) En “Primer BLAST” nos da una advertencia de que “Nuestra plantilla de PCR es muy similar a

las varias secuencias de la base de datos de búsqueda. Para aumentar la posibilidad de encontrar cebadores específicos, revise la lista a continuación y seleccione todas las secuencias que sean objetivos previstos o permitidos”. Seleccionamos a todos ya que corresponden a todos polimorfismos de la APOE y luego “submit”.

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)

Input PCR template NC_000019.10 Homo sapiens chromosome 19, GRCh38.p14 Primary Assembly
Range 44908615 - 44908903

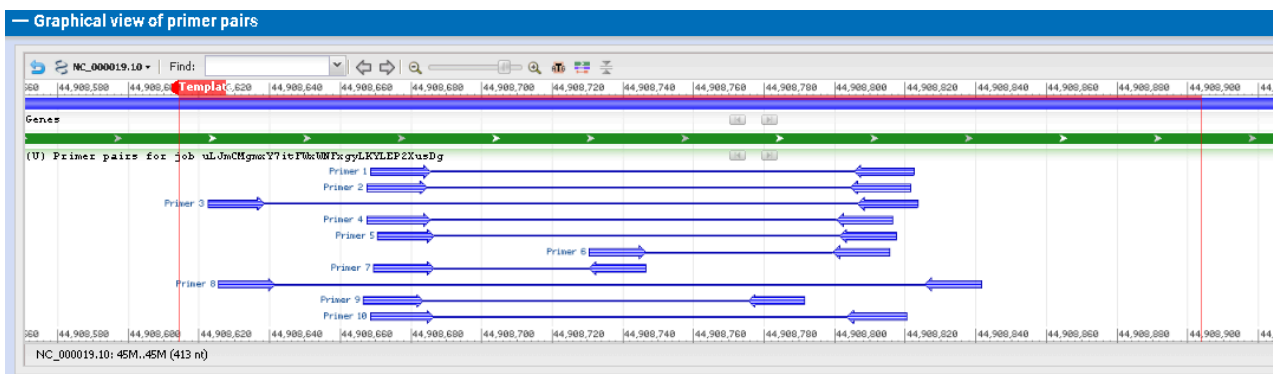
Your PCR template is highly similar to the following sequence(s) from the search database. To increase the chance of finding specific primers, please review the list below and select all sequences (within the given sequence ranges) that are intended or allowed targets.

Select: All None Selected: 5

Accession	Title	Identity	Alignment length	Seq. start	Seq. stop
☒ NM_001302691.2	Homo sapiens apolipoprotein E (APOE), transcript variant 5, mRNA	100%	289	403	691
☒ NM_001302688.2	Homo sapiens apolipoprotein E (APOE), transcript variant 1, mRNA	100%	289	470	758
☒ NM_001302689.2	Homo sapiens apolipoprotein E (APOE), transcript variant 3, mRNA	100%	289	366	654
☒ NM_000041.4	Homo sapiens apolipoprotein E (APOE), transcript variant 2, mRNA	100%	289	388	676
☒ NM_001302690.2	Homo sapiens apolipoprotein E (APOE), transcript variant 4, mRNA	100%	289	466	754

☐ Show results in a new window

h) Revisar visualmente que pares de primers son los óptimos para nuestra amplificación que abarquen los dos polimorfismos.



h) Seleccionar el par de primers que cumplan con los parámetros establecidos F1, R1 Y F4, R4. Se observa que en ambos pares de primers existe la posibilidad de que se amplifiquen otros segmentos más pequeños (100 pb) o más grandes. Para verificar la especificidad se hará una prueba de PCR in silico.

Par de cebadores 1

	Secuencia (5'→3')	Hilo de plantilla	Longitud	Comenzar	Detener	tm	%GC	Auto complementariedad	Autocomplementariedad 3'
Imprimación delantera	TGGAGGAACAACCTGACCC	Más	18	44908583	44908600	56,02	55,56	2,00	2,00
Imprimación inversa	TGCCCATCTCTCCATC	Menos	17	44909017	44909001	54,95	58,82	2,00	0,00
Longitud del producto	435								

Productos en objetivos previstos

> NM_001302690.2 Apolipoproteína E (APOE) de Homo sapiens, variante de transcripción 4, ARNm

longitud del producto = 435

Cebador delantero 1 TGGAGGAACAACCTGACCC 18

Plantilla 434 451

Imprimación inversa 1 TGCCCATCTCTCCATC 17

Plantilla 868 852

longitud del producto = 185

Cebador delantero 1 TGGAGGAACAACCTGACCC 18

Plantilla 434 451

Imprimación inversa 1 TGCCCATCTCTCCATC 17

Plantilla 538 C..A..CG.....G 522

> NM_001302691.2 Apolipoproteína E (APOE) de Homo sapiens, variante de transcripción 5, ARNm

longitud del producto = 435

Cebador delantero 1 TGGAGGAACAACCTGACCC 18

Plantilla 371 388

Par de cebadores 9

	Secuencia (5'→3')	Hilo de plantilla	Longitud	Comenzar	Detener	tm	%GC	Auto complementariedad	Autocomplementariedad 3'
Imprimación delantera	GGAAGTGGAGGAACAACCTG	Más	19	44908578	44908596	55,43	52,63	2,00	2,00
Imprimación inversa	GCCCATCTCTCCATCC	Menos	17	44909016	44909000	55,85	64,71	2,00	0,00
Longitud del producto	439								

Productos en objetivos previstos

> NM_001302690.2 Apolipoproteína E (APOE) de Homo sapiens, variante de transcripción 4, ARNm

longitud del producto = 439

Cebador delantero 1 GGAAGTGGAGGAACAACCTG 19

Plantilla 429 447

Imprimación inversa 1 GCCCATCTCTCCATCC 17

Plantilla 867 851

> NM_001302691.2 Apolipoproteína E (APOE) de Homo sapiens, variante de transcripción 5, ARNm

longitud del producto = 439

Cebador delantero 1 GGAAGTGGAGGAACAACCTG 19

Plantilla 366 384

Imprimación inversa 1 GCCCATCTCTCCATCC 17

Plantilla 804 788

> NM_001302688.2 Apolipoproteína E (APOE) de Homo sapiens, variante de transcripción 1, ARNm

longitud del producto = 439

Cebador delantero 1 GGAAGTGGAGGAACAACCTG 19

Plantilla 433 451

Anexo B: Verificación de la especificidad de los primers diseñados in silico.

- Para la prueba in silico se realiza en la plataforma online UCSC Genome Browser Home.
- Una vez en la página se selecciona la opción “In-Silico PCR”.

- Pegar los primers diseños en la plataforma teniendo en cuenta cual es el Forward y cuál el Reverse y hacer click en “Submit”.

UCSC In-Silico PCR

Genome: Assembly: Target: Forward primer: Reverse primer:

Max product size: Min perfect match: Min good match: Flip reverse primer: ☐ Append to existing PCR result: ☒

About In-Silico PCR

In-Silico PCR searches a sequence database with a pair of PCR primers, using an indexing strategy for fast performance. See an example [video](#) on our YouTube channel. This tool is not guaranteed to find off-target locations for primers, it is optimized for 100% identical matches. For use in primer design consider additional validation with tools such as [primer blast](#).

Configuration Options

Genome and Assembly - The sequence database to search.
Target - If available, choose to query transcribed sequences.
Forward Primer - Must be at least 15 bases in length.
Reverse Primer - On the opposite strand from the forward primer. Minimum length of 15 bases.
Max Product Size - Maximum size of amplified region.
Min Perfect Match - Number of bases that match exactly on 3' end of primers. Minimum match size is 15.
Min Good Match - Number of bases on 3' end of primers where at least 2 out of 3 bases match.
Flip Reverse Primer - Invert the sequence order of the reverse primer and complement it.
Append to existing PCR result - Add this PCR result list to the currently existing track of PCR results.

- d) Revisar la amplificación de F1R1, en la cual se observa la especificidad de nuestro fragmento. En azul se encuentra el SNP rs429358 (Posición: 44908684) y en rojo también la rs7412 (Posición: 44908822).

UCSC In-Silico PCR
>chr19:44908583+44909017 435bp TGGAGGAACAACCTGACCC TGCCCATCTCCTCCATC TGGAGGAACAACCTGACCCcggtggcggaggagacgcgggcacggctgtcc aaggagctgcaggcggcgaggcccggtgggcgcggacatggaggacgt gtggcggcgcttggtgcagtaccgcggcgaggcgaggccatgctcggcc agagcaccgaggagctgcgggtgcgcctcgcctccacctgcgcaagctg cgtaagcggctcctccgcatgccgatgacctgcagaagcgcttgccagt gtaccaggccggggcccgaggggcgccgagcgcggcctcagcgccatcc gcgagcgcttggggcccttggtggaacaggggcgcggtgcgggcccgcact gtgggctccttggcggccagccgctacaggagcggggcccaggcctgggg cgagcggctgcgcgcgcgGATGGAGGAGATGGGCA
Primer Melting Temperatures
Forward: 56.8 C tggaggaacaactgaccc Reverse: 57.9 C tgcccatctcctccatc

- e) Realizar los mismo con los primers F4R4. En azul se encuentra el SNP rs429358 (Posición: 44908684) y en rojo también la rs7412 (Posición: 44908822).

UCSC In-Silico PCR
>chr19:44908578+44909016 439bp GGAAGTGGAGGAACAACCTG GCCCATCTCCTCCATCC GGAAGTGGAGGAACAACCTGaccccgggtggcggaggagacgcgggcacggc tgtccaaggagctgcaggcggcgaggcccggtgggcgcggacatggag gacgtgtggcgccgccttggtgcagtaccgcggcgaggcgaggccatgct cggccagagcaccgaggagctgcgggtgcgcctcgcctccacctgcgca agctgcgtaagcggctcctccgcatgccgatgacctgcagaagcgctg gcagtgtaccaggccggggcccgaggggcgccgagcgcggcctcagcgc catccgcgagcgccttggggcccttggtggaacaggggcgcggtgcgggccc cactgtgggctccttggcggccagccgctacaggagcggggcccaggcc tggggcgagcggctgcgcgcgcGATGGAGGAGATGGGC
Primer Melting Temperatures
Forward: 55.5 C ggaactggaggaacaactg Reverse: 58.8 C gcccatctcctccatcc

- f) Una vez comprobada la especificidad se envían los primers para su síntesis.

ANEXO C. Protocolo para preparación del gel de agarosa, las muestras amplificadas y corrida de la electroforesis.

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4	Protocolo 5
Reactivos	- 0,6 g de Agarosa. - 50 ml de TAE Buffer.	- 0,6 g de agarosa. - 50 ml de TAE Buffer.			
Preparación del gel	- Mezclar la agarosa con el TAE. - Calentar en microondas por 40 s hasta que se haga transparente (Evitar ebullición). - Atemperar y agregar 200 uL del indicador Green start. - Poner en el molde junto con el peine y esperar a que solidifique.	- Mezclar la agarosa con el TAE. - Calentar en microondas por 40 s hasta que se haga transparente (Evitar ebullición). - Atemperar y agregar 4 uL del indicador de Bromuro de etidio. - Poner en el molde junto con el peine y esperar a que solidifique. - Desmoldar y poner en la cámara de electroforesis cubriendo completamente con el buffer de TAE.			
Preparación de las muestras	- Mezclar 15 uL de la muestra del PCR amplificado y 5 uL de azul de bromofenol. - Pipetear los 20 uL de cada muestra en cada pocillo, - Agregar el blanco y 4 uL del marcador de peso molecular en las esquinas.	- Mezclar 10 uL de la muestra del PCR amplificado y 10 uL de azul de bromofenol - Pipetear los 20 uL de cada muestra en cada pocillo. - Agregar el blanco y 4 uL del marcador de peso molecular en las esquinas.			
Lectura de la muestra	Cámara de luz azul.	Cámara de UV a longitudes de onda baja y alta.			