

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Programa: Doctorado en Ciencias Biología, Departamento de Biología,
Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Sede: Cali – Meléndez

Resumen: El envejecimiento continuo de la población, como consecuencia del aumento en la expectativa de vida, ha sido asociado con un aumento en la incidencia de enfermedades crónicas tales como diabetes, cáncer, desórdenes cardíacos y neurológicos entre los cuales la Enfermedad de Alzheimer (EA) es el más común, representando del 50% al 70% de todos los casos de demencias. La genética de la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío es compleja debido a la naturaleza heterogénea de este trastorno. Entre los factores de riesgo más importantes para la EA se encuentran genes que se expresan en vías metabólicas relacionadas con el sistema nervioso. Aunque el gen APOE, y, específicamente su variante APOE*4 representa el factor de riesgo genético más fuerte para la EA, los estudios genético moleculares han identificado más de 30 loci adicionales, donde cada uno aporta un efecto relativamente pequeño. Los loci conocidos asociados con EA explican solo alrededor del 30% de la variación génica, por lo tanto, gran parte de esta gama de variantes genéticas permanece sin identificación y sin explicación. Con el objetivo de caracterizar genes asociados a susceptibilidad de Enfermedad de Alzheimer (forma esporádica) y alteración metabólica, este capítulo se basó en el estudio de variantes patogénicas con carga mutacional de impacto proteico, halladas en los genes de pacientes con Alzheimer. El APOE como gen crucial fue analizado junto a otras moléculas donde fue validado su efecto como biomarcadores potenciales en el diagnóstico de Alzheimer para población colombiana.

En total fueron secuenciados 14 exomas (10 de pacientes con EA y 4 controles – personas sin diagnóstico de EA). Los 10 pacientes fueron caracterizados previamente para el gen APOE a objeto de asegurar la presencia de la variante APOE4 al menos en heterocigosis.

Fueron clasificados 537 genes con variación patogénica, de los cuales 150 fueron representados en los exomas de pacientes estudiados. Los diferentes métodos de enriquecimiento bioinformático como el ClinVar (Variantes Clínicamente Relevantes) y la base de datos funcional KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), determinaron que vías o procesos importantes relacionados al desarrollo o progresión de Alzheimer, podrían estar involucrados con estos genes. Al caracterizar estas biomoléculas se obtuvo conocimiento sobre las funciones etiológicas en la enfermedad. La presencia de múltiples genes activos en cerebro, sangre y demás tejidos, puede proporcionar la explicación mediante la cual la acumulación de amiloide- β desencadena la etiología patológica. Todos estos análisis permitieron identificar regiones de susceptibilidad genética asociada a marcadores metabólicos en la población con enfermedad de Alzheimer y también, que no se halla un solo gen responsable de la aparición de Alzheimer, sino de grupos de genes que inciden en múltiples vías que al final desencadenan la patología.

Palabras claves: Enfermedad de Alzheimer, APOE, Secuenciación de Exoma, metabolismo, Enfermedad crónica.

UNIVERSIDAD DEL VALLE



**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON
SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

VIVIAN ANDREA PERDOMO DÍAZ. MSc

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
SANTIAGO DE CALI**

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE



**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON
SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

VIVIAN ANDREA PERDOMO DÍAZ. MSc

Director

GUILLERMO BARRETO. PhD

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
SANTIAGO DE CALI**

2023

NOTA DE APROBACIÓN

El presente trabajo titulado “**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**” presentado por la estudiante VIVIAN ANDREA PERDOMO DÍAZ, para optar al título de Doctor en Ciencias-Biología fue aprobada por:

Director: GUILLERMO BARRETO, PhD

Jurado 1: _____

Jurado 2: _____

Jurado 3: _____

Fecha: _____

DEDICATORIA

A ti mis ojos hermosos por iluminarme cada día. Te amo infinitamente hijo mío.

AGRADECIMIENTOS

A mi director el Dr Guillermo Barreto quién con su paciencia y dedicación, siempre acogió mis inquietudes, me brindó su apoyo y su total confianza al creer en mis ideas frente al estudio de una patología tan compleja. De igual manera fue quién superviso cada labor dentro del proyecto, desde la ejecución financiera como de cumplimiento.

Al Dr Henry Fabian Tobar, por permitirme hacer parte de su grupo de investigación y el apoyo recibido en el entrenamiento de los análisis bioinformáticos.

A Doctorados Nacionales Colciencias por mi beca doctoral.

A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle por la financiación del proyecto CI 71213.

Al postgrado en Ciencias Biología por el apoyo en compra de materiales y reactivos usados en los procesos de laboratorio.

A todos mis compañeros del grupo de Investigación en Genética Molecular Humana por su amistad y trabajo continuo, especialmente a Brigitte y a lulito.

Finalmente, a cada una de las familias quienes aferradas a un diagnóstico preventivo o de ayuda a posteriores generaciones para disminuir los procesos atroces que se viven con el Alzheimer, permitieron el estudio en sus padres, abuelos, y esposas. Todo con el acompañamiento y dirección de la Fundación Alzheimer de Cali, donde doy infinitas gracias a la Dra Jaqueline Arabia Buraye, directora de la institución y quien siempre acompañó nuestro trabajo de la mano de su equipo profesional.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN GENERAL	9
CAPITULO I	15
1. FRECUENCIAS POLIMORFICAS DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN POBLACIÓN AFRODESCENDIENTE DE BUENAVENTURA VALLE DEL CAUCA	15
1.1 MATERIALES Y METODOS	19
1.1.1 Consideraciones éticas	19
1.1.2 Caracterización de la población de estudio	19
1.1.3 Obtención de la muestra biológica (Tejido sanguíneo)	20
1.1.4 Amplificación mediante la PCR del exón 4 de APOE	22
1.1.5 Determinación de los haplotipos APOE	22
1.1.6 Análisis estadístico	23
1.2 RESULTADOS	26
1.3 DISCUSION	28
1.4 CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFIA	32
CAPITULO II	35
2. ANÁLISIS DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	35
2.1 Generalidades de la enfermedad de Alzheimer	41
2.2 Alzheimer; principios genéticos y moleculares	44
2.3 Otros marcadores moleculares en el Alzheimer	47

2.4 MATERIALES Y METODOS	50
2.4.1 Caracterización fenotípica de la población de estudio	50
2.4.2 Procesamiento de muestras y tipificación de APOE en pacientes	55
2.4.3 Análisis Bioinformático de Éxomas	56
2.4.4 Evaluación de Calidad de Datos Crudos y Preprocesamiento	56
2.4.5 Análisis de la Variante	57
2.5 RESULTADOS	59
2.5.1 Características fenotípicas encontradas en los pacientes con Alzheimer	59
2.5.2 Determinación de genotipos APOE en población afectada con Alzheimer e individuos sin diagnóstico	60
2.5.3 Selección de genotipos APOE por paciente afectado con Alzheimer e individuos sin demencia para análisis de Exoma	66
2.5.4 Gráficos con variantes determinadas con mayor, medio y bajo impacto deletéreo en los diferentes genes encontrados por exoma estudiado	73
2.6 DISCUSION	82
2.6.1 Alelos APOE sus frecuencias y distribución en afectados y no afectados con Alzheimer	83
2.6.2 Sinergismo de APOE con genes obtenidos a partir de Exomas	85
2.6.3 Patogenicidad Vs Asociación Fenotípica	91
2.7 CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFIA	95
DISCUSION GENERAL	104
CONCLUSIONES GENERALES	106
BIBLIOGRAFIA GENERAL	107
ANEXOS	117

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de haplotipos APOE con base en la metodología de RFLP's.	23
Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas del Locus APOE en población afrodescendiente de Buenaventura Valle del Cauca	26
Tabla 3. Comparación de frecuencias alélicas del gen APOE entre diferentes poblaciones colombianas y la población de Buenaventura	27
Tabla 4. Factores de riesgo potenciales al desarrollo de Alzheimer	43
Tabla 5. Patologías asociadas al desarrollo de Alzheimer	51
Tabla 6. Hábitos de riesgo para Alzheimer	52
Tabla 7. Criterios de inclusión	53
Tabla 8. Criterios de exclusión	54
Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del gen APOE en una muestra de casos y controles del Valle del Cauca	62
Tabla 10. Grupos etarios de la Fundación Alzheimer sede Cali con diagnóstico de EA según el genotipo APOE	63
Tabla 11. Odds Ratio (OR) de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico de acuerdo a los genotipos y alelos APOE en individuos del Valle del Cauca	64
Tabla 12. Distribución de los genotipos y alelos APOE en pacientes con Alzheimer de tres ciudades en Colombia	65
Tabla 13. Selección de genotipos de pacientes con la enfermedad de Alzheimer e individuos controles sin la patología, para análisis de exoma	67
Tabla 14. Clasificación por impacto biológico de número de genes encontrados en los exomas analizados	68
Tabla 15. Genes seleccionados con mayor prevalencia en relación patológica y fenotipo de la población de estudio	69
Tabla 16. Indicadores génicos patológicos a partir de los exomas de pacientes con Alzheimer	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del Departamento del Valle del Cauca	20
Figura 2. Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer	42
Figura 3. Factores de riesgo genéticos prevalentes o validados para la forma tardía del Alzheimer	45
Figura 4. Principales vías implicadas en la EA y genes afectados	48
Figura 5. Factores que involucran el Alzheimer tardío	48
Figura 6. Paso a paso del análisis de las muestras de pacientes y controles	56
Figura 7. Esquema del flujo de trabajo de SeqMule y herramientas usadas en cada paso	58
Figura 8. Frecuencias relativas de otras patologías y estilo de vida de los pacientes de la Fundación Alzheimer sede Cali con diagnóstico de EA	60
Figura 9. Red de interacción de genes candidatos	72
Figura 10. A. Mapa de calor y agrupamiento de genes con número alto de variantes de cambio halladas en el exoma de la población de estudio. B. Correlación de principales vías biológicas en que actúan los diferentes genes	74
Figura 11. A. Mapa de calor y agrupamiento de genes con número medio de variantes modificables halladas en el exoma de la población de estudio. B. Correlación de principales vías biológicas en que actúan los diferentes genes	76
Figura 12. A. Mapa de calor y agrupamiento de genes con número bajo de variantes modificables halladas en el exoma de la población de estudio. B. Correlación de principales vías biológicas en que actúan los diferentes genes	78
Figura 13. A. Genes con rasgo patogénico asociado a metabolismo lipídico. El impacto fenotípico de estos genes, aunque no es severo dado a que sus frecuencias no son muy altas, tienen influencia en la armonía característica de la Enfermedad de Alzheimer	79

Figura 14. A. Genes con rasgo patogénico asociado a metabolismo lipídico.

B Correlación de principales rutas biológicas en que actúan los
diferentes genes

81

INTRODUCCIÓN GENERAL

La enfermedad del Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que representa entre el 60% y 80% de los casos totales de demencia en el mundo y tiene un espectro de síntomas que incluyen: pérdida progresiva de la memoria, cambios en el comportamiento y dificultad en la comunicación (Alzheimer's Association, 2019; González *et al.*, 2020). Previo a la expresión sintomatológica de la EA se incrementa la concentración cerebral de las proteínas beta amiloide (β A) y una forma anormal de la proteína tau, las cuales interfieren con la sinapsis neuronal y el transporte intercelular de moléculas esenciales. Estos procesos conllevan a la muerte neuronal y encogimiento de regiones cerebrales comprometidas en la cognición y comportamiento (Prasad y Rao, 2018; Alzheimer's Association, 2019; Zhu *et al.*, 2020). El 90% de los casos de EA son esporádicos en la edad adulta, mientras que el resto de los casos es de origen familiar; sin embargo, ambas formas de la enfermedad tienen explicaciones genéticas (Meza-Cely *et al.*, 2020).

La edad es uno de los determinantes más importantes para desarrollar el Alzheimer esporádico, siendo la población mayor a 65 años la más vulnerable (Meza-Cely *et al.*, 2020). No obstante, la forma esporádica de EA cuenta con causas genéticas y no genéticas que dificultan su entendimiento. Algunas características relacionadas con una mayor susceptibilidad a la enfermedad son la etnicidad, el sexo, traumatismo craneoencefálico, enfermedades cardiovasculares, historia familiar de Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2, epilepsia y depresión (Alzheimer's Association, 2019; Edwards *et al.*, 2019; Eid *et al.*, 2019). Diferentes aspectos del estilo de vida también hacen parte de los factores de riesgo modificables para la EA que al ser evitados disminuyen la probabilidad de desarrollo de EA y comprenden aspectos como: ausencia de actividad física, dieta, tabaquismo, alcoholismo y exposición a pesticidas (Edwards *et al.*, 2019; Eid *et al.*, 2019).

La evidencia genética más fuerte para la forma esporádica de la enfermedad, es atribuida al gen APOE, el cual se localiza en el cromosoma 19 y codifica para la apolipoproteína E (ApoE), una proteína de 299 aminoácidos que media el metabolismo del colesterol principalmente en el hígado y cerebro; específicamente su función es de gran importancia para el mantenimiento de la integridad neuronal ya que provee el material necesario para el crecimiento y reparación celular (Beyer, 2002; Gerdes, 2002; Abondio *et al.*, 2019; Eid *et al.*, 2019; González *et al.*, 2020; Rasmussen *et al.*, 2020). APOE tiene tres alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ originados por dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el exón 4 y cada variante da lugar a tres isoformas de la proteína: E2, E3 y E4 con propiedades estructurales y funcionales diferentes (Hixson y Vernier, 1990; Gerdes, 2002; Abondio *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020). Estos cambios estructurales generan que las tres isoformas alcancen diferentes niveles de lipidación y unión a receptores celulares, resultando en una eficiencia variable del metabolismo lipídico dependiendo de la forma de la proteína que se tenga (Abondio *et al.*, 2019; Flowers y Rebeck, 2020; Husain *et al.*, 2021). La lipidación de apoE4 es baja y al ser su región de unión a lípidos más expuesta, promueve unión preferencial a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); a su vez, la conformación de apoE2 y apoE3 les confiere mayor potencial de lipidación y afinidad con lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Gerdes, 2002; Martínez-Magaña *et al.*, 2019; Husain *et al.*, 2021). Específicamente se ha encontrado que apoE4 está asociada a alto colesterol LDL en plasma en comparación a las otras dos isoformas (Martínez-Magaña *et al.*, 2019; Husain *et al.*, 2021). Por otro lado, apoE2 se correlaciona con altos niveles de triglicéridos en plasma debido a que su estructura perjudica la unión al receptor LDLR, impidiendo la eliminación lipídica, finalmente resultando en hiperlipoproteinemia tipo III (Husain *et al.*, 2021).

El factor de riesgo genético más importante para EA esporádico es el alelo APOE ϵ 4, cuya presencia aumenta la probabilidad de desarrollo de la enfermedad aproximadamente entre 8 y 12 veces para portadores homocigotos. A su vez, el Alzheimer familiar donde su genética se clasifica en tres genes de causa directa como lo son el gen de la Presenilina (PSEN1 y PSEN2), el péptido Beta y proteínas Tau.

Los cambios generados dentro de la proteína favorecen depósitos de β A, proteína anormal tau y apoE4 sin unirse a lípidos en forma de placas seniles y fibrillas que a su vez causan la pérdida progresiva de funciones cognitivas y ejecutivas por muerte neuronal (Salcedo Tacumá, 2018; Abondio *et al.*, 2019; Eid *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020; Husain *et al.*, 2021).

Debido a su importancia en la EA, el procesamiento de metabolitos secundarios y en especial la degradación, transporte y función de los lípidos a nivel cerebral, hacen que las frecuencias de APOE sean evaluadas en diferentes poblaciones dado a que éstas varían según el grupo étnico o genética de la población (Perdomo 2013; Abondio *et al.*, 2019; Husain *et al.*, 2021), generando un impacto de mayor o menor grado en susceptibilidad a desarrollar Alzheimer.

Dicha variabilidad, corroborada por diferentes investigadores, abre la necesidad de dar argumento y comprensión acerca de cómo un gen tan pequeño (4 exones) cobra un efecto drástico en el genoma dependiendo de la isoforma que lo conforme. De igual manera cómo la interacción entre este gen y demás genes involucrados en diferentes vías metabólicas, alteran substancialmente el sistema nervioso.

Esta armonía celular al ser alterada como consecuencia de cambios en el genoma (mutaciones directamente) repercute negativamente sobre múltiples vías de acción en la homeostasis celular, sumado a ello, el efecto mayor que ejerce el estilo de vida y hábitos característicos de cada población que concluyen en enfermedades metabólicas y autoinmunes cómo la hipertensión, diabetes,

hipercolesterolemia, artritis, etc. que crean una base central de riesgo al deterioro cerebral siendo patologías que aquejan a muchos individuos desde edades temprana y vulneran la correcta función y procesamiento proteico del cerebro en edades adultas, convirtiendo el envejecimiento en un problema de salud pública.

Para Colombia, se conoce la distribución de alelos y genotipos APOE en población sin demencia del Sur Occidente y centro del País (Rivera *et al.*, 2015; Perdomo, 2013), concluyendo que el componente multiétnico y ancestría de esta región genera infinidad de inquietudes respecto al impacto o ventaja que proporcionan estas variantes sobre los individuos. Ejemplo de ello es el estudio realizado por Perdomo 2013, donde a partir de 527 individuos sanos, no relacionados, y con diferencias en su etnia, se encontraron alteradas la distribución de sus frecuencias, indicando un componente genético diferencial entre poblaciones lo cual puede influir en el dosaje de alelo E4 y cómo estas variantes pueden modular fuertemente al desarrollo de patologías neurológicas como el Alzheimer y/o demás enfermedades metabólicas, siendo importante para Colombia estudios de interés en población afectada con este tipo de demencia.

Es a partir de las investigaciones realizadas en el gen de la apolipoproteína E y la distribución de sus frecuencias alélicas y genotípicas en el Sur Occidente y Centro de Colombia, investigaciones realizadas por Rivera*, 2015 & Perdomo,* 2013 (*Grupo de Investigación en Genética Molecular Humana – Universidad del Valle), que surge la necesidad de analizar los efectos biológicos críticos de este gen en población afectada con Alzheimer, todo con el objetivo de visualizar la sinergia existente entre APOE y demás genes que estén generando efecto de suma como mecanismo de susceptibilidad a la patología.

Es por ello, que la esta investigación se presenta en dos capítulos:

Capítulo I: Estudio de frecuencias Polimórficas del gen de la Apolipoproteína E en población sin demencia del Valle del Cauca.

La población de estudio para este primer capítulo se caracterizó por elevadas frecuencias genotípicas y alélicas del alelo E4 tanto en estado homocigoto como heterocigoto, siendo un perfil genético clave en la población colombiana por los diversos procesos de migración y emigración que se han dado en el Departamento del Valle del Cauca, lo cual puede incidir positiva o negativamente sobre fenotipos patológicos persistentes en sus pobladores.

Capítulo II: Análisis de regiones genómicas asociadas con susceptibilidad al desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer en población afectada del Valle del Cauca – Colombia.

El capítulo II, se crea como necesidad de poder esclarecer que otros mecanismos genéticos pueden estar desencadenando la aparición de la patología, para ello, los estudios fueron realizados en individuos afectados con demencia tipo Alzheimer, procedentes de la Fundación Alzheimer de Cali. Aquí no solo fue necesario detectar la isoforma ApoE responsable de sumar al deterioro cognitivo, sino también análisis de exomas de los pacientes, en búsqueda de respuesta molecular a la aparición de esta enfermedad crónica.

HIPÓTESIS

H1: La variabilidad de las frecuencias tanto alélicas como genotípicas del gen APOE en población sin demencia del valle del Cauca, favorecen susceptibilidad al desarrollo de Alzheimer o demás patologías crónicas.

H2: Pacientes del Valle del Cauca con Alzheimer presentan mutaciones que afectan la función de proteínas involucradas en diferentes vías no relacionadas con demencia tipo Alzheimer.

H3: Las regiones genómicas encontradas en pacientes afectados e individuos no afectados por la patología son influenciadas biológica y metabólicamente por la interacción con el gen APOE.

CAPITULO I

1. FRECUENCIAS POLIMORFICAS DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN POBLACIÓN AFRODESCENDIENTE DE BUENAVENTURA VALLE DE CAUCA

Resumen

Diferentes polimorfismos del gen de Apolipoproteína E (ApoE) han sido implicados en la etiología de patologías neurodegenerativas y cardiovasculares; sus distintas isoformas son codificadas por tres alelos comunes, E2, E3 y E4, siendo este último el principal factor de riesgo a enfermedad de Alzheimer y deterioro metabólico. Dado que el origen étnico y poblacional han mostrado ser factores determinantes del genotipo de APOE y considerando la contribución Amerindia, Afrodescendiente y europea en la población colombiana, se analizó la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del gen APOE en población afectada y no afectada con la Enfermedad de Alzheimer en el Valle del Cauca. Esto con el propósito de analizar el marcador de riesgo genético más importante para el desarrollo de la patología, donde los portadores del alelo $\epsilon 4$ presentan efectos deletéreos sobre la proteína que conllevan a la aparición de demencia tipo Alzheimer. Con el objetivo de evaluar la frecuencia de estas isoformas mediante marcadores RFLP's fueron analizados 348 individuos sin demencia y con descendencia afrodescendiente del municipio de Buenaventura, encontrándose una prevalencia del 27.3% de frecuencia del genotipo E3E4 y una del 6% en el aleo E4. Marcador genético significativo para desórdenes de metabolismo lipídico y enfermedad de Alzheimer.

Referente a los demás genotipos y alelos del gen ApoE, sus frecuencias fueron de E3E3 51.1%, E2E3 12.1%, E2E4 3.5% y E2E2 0%, alelos E3 70.8% y E2 7.8%.

Palabras clave: Apolipoproteína E; ApoE E4; Enfermedad de Alzheimer; Población afrodescendiente colombiana

Abstract

Different polymorphisms of the Apolipoprotein E (ApoE) gene have been implicated in the etiology of neurodegenerative and cardiovascular pathologies; its different isoforms are encoded by three common alleles, E2, E3 and E4, the latter being the main risk factor for Alzheimer's disease and metabolic deterioration. Given that ethnic and population origin have been shown to be determinant factors of the APOE genotype and considering the Amerindian, Afro-descendant and European contribution in the Colombian population, the distribution of the allelic and genotypic frequencies of the APOE gene in the affected and unaffected population was analyzed with Alzheimer's disease in Valle del Cauca. This with the purpose of analyze the most important genetic risk marker for the development of the pathology, where carriers of the $\epsilon 4$ allele present deleterious effects on the protein that lead to the appearance of Alzheimer's-type dementia. In order to evaluate frequency of these isoforms using RFLP's markers, 348 individuals without dementia and with Afro-descendant descent from the municipality of Buenaventura were analyzed, finding a prevalence of 27.3% frequency of the E3E4 genotype and one of 6% in the E4 allele. This is a significant genetic marker for lipid metabolism disorders and Alzheimer's disease.

Relating to genotypes and alleles of the ApoE gene, their frequencies were E3E3 51.1%, E2E3 12.1%, E2E4 3.5% and E2E2 0%, E3 alleles 70.8% and E2 7.8%.

Keywords: Apolipoprotein E; ApoE4; Alzheimer's disease; Colombian Afro-descendant population

Introducción

El gen de apolipoproteína E, como principal componente de las apoproteínas en los quilomicrones, codifica una proteína de 299 aminoácidos y ha sido utilizado de manera extensiva como un marcador génico de riesgo al desarrollo de demencia tipo Alzheimer y de alteraciones en el metabolismo de las grasas (Flowers 2020). Su papel fundamental en el transporte de lipoproteínas y en el mantenimiento homeostático de los lípidos en órganos como hígado y cerebro, (Eid *et al.*, 2019) hacen que su genotipo sea muy importante desde el punto de vista patológico.

Los alelos ApoE E2, E3 y E4, se diferencian por un residuo aminoacídico ubicado en los codones 112 y 158 de su péptido (Raffai *et al.*, 2019). Son numerosos los estudios centrados en el análisis de cada una de estas variantes génicas, de cómo afectan el correcto funcionamiento y expresión del gen y el impacto fisiológico que logran desencadenar.

En caucásicos europeos el alelo E2 se asocia a problemas de diabetes e hipocolesterolemia (Eisenberg *et al.*, 2010) pero menor riesgo a demencia (Hussain, 2021), contrario a lo registrado para el alelo E4 el cual se ha identificado como un fuerte factor de riesgo a varias enfermedades incluyendo dislipidemias, arteriosclerosis, enfermedad coronaria y demencia tipo Alzheimer (Zhu *et al.*, 2020). La isoforma E3 con una frecuencia del 70-80% está asociada a una función normal del gen APOE (Eid *et al.* 2019).

Si considerado globalmente la distribución de las frecuencias alélicas APOE estas siguen la misma tendencia E3>E4>E2. No obstante, diferentes estudios refuerzan la idea que la distribución de estos polimorfismos difiere de una población a otra, pudiendo ser distintivos de cada etnia, región y país (Perdomo 2013). La población afrodescendiente se caracteriza por un aumento considerable en la frecuencia del alelo E4, mientras que para la población general se han reportado frecuencias inferiores

al 15% (en la población negra presenta una prevalencia de hasta el 25%) (Sing *et al.*, 2016), de otro lado los amerindios o nativos americanos se caracterizan por la ausencia del alelo E2, (Hussain 2021). La mayor frecuencia (superior al 70%) del alelo E3 en las diferentes poblaciones estudiadas, podría ser influenciada por factores ambientales como el tipo de dieta dado a que este alelo prefiere lipoproteínas más pequeñas y ricas en colesterol (Eisenberg *et al.*, 2010).

Estudios en Colombia con poblaciones mestizas de Bogotá, Antioquia y Barranquilla han mostrado que no hay diferencias significativas en la frecuencia de alelos APOE para estas poblaciones, debido posiblemente al gran flujo génico entre el centro y noroeste colombiano (Vélez-Pardo *et al.*, 2014) y posiblemente también a la ancestría europea y asiática de estas poblaciones (Abondio *et al.*, 2019). Cuando se consideraron poblaciones indígenas, las frecuencias APOE fueron diferentes a las presentadas en las poblaciones mestizas (Perdomo, 2013). Estos estudios muestran claramente que la heterogeneidad APOE no es exclusiva de poblaciones europeas y asiáticas, sino que también está presente en indígenas suramericanos donde la ausencia del alelo E2 es notable. Adicionalmente factores como la ancestría poblacional, inmigración y admixture pueden explicar esta heterogeneidad APOE en las diferentes poblaciones analizadas.

La población afrodescendiente por presentar patrones de ancestría diferenciados de las otras etnias representan conglomerados humanos de interés para el estudio de la heterogeneidad APOE. En Colombia no son conocidos estudios involucrando población afrodescendiente de manera exclusiva. El municipio de Buenaventura fundado en el año de 1540, localizada en el Departamento del Valle, Suroccidente de Colombia, con una población de 415640 habitantes y, con una componente afrodescendiente del 88,5% constituye una población de interés para la valoración de la heterogeneidad APOE.

La alta frecuencia de los alelos E2 y E4 en individuos con origen afroamericano quienes bajo estas variantes alélicas han demostrado susceptibilidad a alteraciones en el metabolismo de grasas y/o enfermedades coronarias, plantean la necesidad de establecer la frecuencia de estos alelos. El objetivo del capítulo I, fue estimar la distribución de frecuencias tanto alélicas como genotípicas del gen APOE en una población con un marcado componente afrodescendiente, como es la población urbana del municipio de Buenaventura, localizada en el sur occidente colombiano.

1.1 MATERIALES Y METODOS

1.1.1 Consideraciones éticas

El presente estudio hace parte del proyecto “Identificación de regiones genómicas asociadas a susceptibilidad de la enfermedad de Alzheimer” que desarrolla el Grupo de Investigación en Genética Molecular Humana del Departamento de Biología de la Universidad del Valle. El proyecto cuenta con el aval del Comité de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (Acta No 022-018), siguiendo los lineamientos que plantea la resolución 8340 de 1993, emanada del Ministerio de Salud (ahora Ministerio de Salud y Protección Social). Todas las muestras se obtuvieron con consentimiento informado y firmado por cada persona (Anexo A).

1.1.2 Caracterización de la población de estudio

Se estudiaron 348 individuos (72 hombres y 276 mujeres) afrodescendientes provenientes de las 12 comunas de la zona urbana Buenaventura - Colombia. Se excluyeron del estudio extranjeros, visitantes o habitantes que no presentaran origen y/o nacimiento en la ciudad. De igual forma los participantes no estuvieron emparentados entre sí en la misma generación y solo se permitió miembros

de hasta 2 generaciones por familia. De esta muestra, 70 individuos correspondieron a menores de edad (≤ 18 años) y 278 individuos fueron adultos.



Figura 1. Mapa del Departamento del Valle del Cauca. En color verde la región geográfica de Buenaventura – zona del Pacífico colombiano.

1.1.3 Obtención de la muestra biológica (Tejido sanguíneo)

De cada individuo fueron extraídos 5ml de sangre periférica en la zona urbana del municipio de Buenaventura. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle donde fue extraído el ADN de cada una de ellas.

Extracción de ADN

El método de “*Salting-Out*” de Miller *et al.* (1988) modificado, se empleó para la extracción del ADN de cada una de las muestras de sangre. Este procedimiento se realizó de la siguiente manera:

Inicialmente, se adicionaron 2 ml de solución de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 10 mM y EDTA 0.1 mM pH 7.4) en 1 mL de sangre periférica (con EDTA), incubando en baño de hielo durante 20 minutos. Cada 10 minutos se efectuó inversión de la muestra. Se centrifugó a 7000 rpm por 10 minutos para la precipitación de leucocitos y la remoción de eritrocitos. Posterior a ello el material fue resuspendido en 1.5 mL de solución de lisis para eritrocitos, colocándose en baño de hielo durante 15 minutos, agitando nuevamente por inversión antes y a los siete minutos de incubación. De nuevo se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y repitiendo los últimos cuatro pasos (resuspender, encubar, centrifugar y descartar) máximo dos veces.

Una vez removidos los eritrocitos se resuspendió en 300 µL de solución de lisis de leucocitos (Tris-HCl 10mM, NaCl 400mM y EDTA 2mM pH 8.2), adicionando 20µL de SDS al 10% y 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL). Se resuspende e incuba en baño María a 37°C durante 20 horas.

Pasado este tiempo, fueron agregados 300 µL de NaCl 6M, se agitó vigorosamente durante 15 segundos. La muestra se centrifugó a 7000 rpm durante 20 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo Vacutainer[®] nuevo. Se agregó 1 mL de etanol absoluto (100%) frío, realizando movimientos suaves de inversión hasta formar un “cuerpo viscoso” (ADN), este fue tomado con una punta estéril y almacenado en tubos eppendorf con 150- 300 µL de Low-TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0). Se incubó en baño María a 37°C durante 2 horas, una vez el ADN se diluyó

completamente seprocedió a almacenarlo a 4°C.

1.1.4 Amplificación mediante la PCR del exón 4 del gen APOE

Para determinar el genotipo de los diferentes individuos con relación a los haplotiposAPOE se llevó a cabo una adaptación de la metodología publicada por Hixon & Vernier (1990) y Arboleda y cols., (2001). Para la amplificación del ADN por la PCR se trabajó con un volumen final de 30 µl / individuo conteniendo: 0.25 unidades de Taq ADN polimerasa, 0.2 µM de cada iniciador (F4 Foward 5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3' y F6 Reverse 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'), 50 µM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl₂, 3 µl de buffer 10 X y 50 ng de DNA.Cada ciclo de reacción de amplificación de la PCR constó de: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, hibridación 60°C por 1 minuto y extensión 74°C por 1 minuto.

El tiempo de la primera denaturación fue de 5 minutos y el de la últimaextensión de 7 minutos. El número de ciclos fue de 30.

La verificación de la reacción de amplificación por la PCR fue realizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con nitrato de plata.

1.1.5 Determinación de los haplotipos APOE

Los haplotipos fueron detectados mediante PCR-RFLP's. La metodología dependede la presencia o ausencia de un sitio de corte para la enzima de restricción específica la cual identifica o no la presencia de la mutación que caracteriza cada uno de los haplotipos. En consecuencia, cada fragmento amplificado fue digerido "overnight" con 5 unidades de la enzima de restricción *HhaI* a 37°C. Los diferentes fragmentos generados fueron separados en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con nitrato de plata. El tamaño de cada uno de los fragmentos generados fue determinado

utilizando marcadores de peso molecular apropiados y cada haplotipo mostró combinaciones únicas de fragmentos de ADN resultantes de la digestión con *Hha I*, como está indicado en la tabla 1.

Tabla 1. Identificación de haplotipos APOE con base en la metodología de RFLP's.

Haplotipos APOE Homocigotos y Heterocigotos	Tamaño de los fragmentos en pb (pares de bases)
E4/E4	72, 48, 35, 19*
E3/E3	91, 48, 35
E2/E2	91, 82
E2/E4	91, 82, 72 y 48
E2/E3	91, 82, 48
E3/E4	91, 72, 48

* Este fragmento por su tamaño generalmente no es visible en el gel.

1.1.6 Análisis estadístico

La determinación de las frecuencias de APOE se hizo por conteo directo. Los intervalos de confianza para las frecuencias alélicas fueron determinados según la fórmula propuesta por Nielsen et al. (1976, citado por Gerdes, 2002) con $\alpha = 0.05$. Este método se basa en una aproximación normal e incluye una corrección de continuidad para tamaños pequeños (Fórmula 1).

$$CI_{Low} = (n + 1.96^2)^{-1} [r - 0.5 + \frac{1.96^2}{2} - 1.96\sqrt{\frac{(r - 0.5)(n - r + 0.5)}{n}} + \frac{1.96^4}{4}]$$

$$CI_{High} = (n + 1.96^2)^{-1} [r + 0.5 + \frac{1.96^2}{2} - 1.96\sqrt{\frac{(r + 0.5)(n - r - 0.5)}{n}} + \frac{1.96^4}{4}]$$

Dónde: p = número de alelos Xi ; n = tamaño de muestra y r = número total de alelos (n*p).

Mediante el programa Arlequín versión 3.5 se evaluó el Equilibrio Hardy-Weinberg para este *locus*. Este software emplea una prueba exacta análoga a la prueba de Fisher para tablas de contingencia de 2X2, pero extendido a tablas de contingencia triangular de tamaño arbitrario (Excoffier & Lischer, 2010). Así mismo, esta prueba usa una versión modificada del algoritmo de cadenas de Markov, descrito por Guo y Thompson (1992, citado por Excoffier & Lischer, 2010) y es adecuada cuando los tamaños de la muestra son pequeños y/o no se cumplen las condiciones necesarias para que la aplicación de la prueba de χ^2 sea adecuada, en este caso la baja frecuencia de alelos E2.

Las frecuencias de APOE de las distintas poblaciones se obtuvieron de la literatura, considerando algunos parámetros como: a) edades menores a los 65 años; b) que no fuesen estudios de caso-control con asociaciones positiva a patologías.

Para evidenciar la existencia de diferencias significativas entre estas poblaciones y las frecuencias encontradas para Colombia se realizó la prueba exacta de diferenciación poblacional de Raymond & Rousset (1995), mediante el programa Arlequín versión 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Esta prueba permite determinar diferencias entre las frecuencias alélicas entre poblaciones basado en procedimientos no paramétricos exactos, representando una prueba confiable e insesgada, incluso para tamaños pequeños y/o frecuencias alélicas muy bajas, y además permite la comparación entre poblaciones con tamaños de muestra muy distintos (Raymond & Rousset, 1995).

Por otra parte, las diferencias en las frecuencias de APOE entre poblaciones fueron calculadas con el estadístico F_{st} mediante el programa GenAlEx6.2 (Peakall & Smouse, 2020), el cual es un estimador por excelencia de la diferenciación poblacional, cuantificando el déficit de heterocigosis esperado entre muestras que representen subpoblaciones divergentes en las frecuencias alélicas (Uribe *et al.*, 2006).

Finalmente, las frecuencias de las poblaciones agrupadas en la tabla 3 fueron nuevamente comparadas mediante las pruebas de Raymond & Rousset (1995), con el fin de corroborar si las comparaciones entre poblaciones eran las esperadas y así contrastar los resultados obtenidos con los valores de F_{st} y la prueba exacta de diferenciación poblacional.

1.2 RESULTADOS

Se analizaron un total de 348 individuos pertenecientes a la zona urbana de la ciudad de Buenaventura. Las frecuencias genotípicas encontradas en la población fueron: E3/E3=51.1%, E3/E4=27.3%, E4/E4=6%, E2/E3=12.1%, E2/E4=3.5%, y E2/E2=0% y las frecuencias alélicas fueron: E3=70.8%, E4=21.4% E2=7.8%. La población total se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg, con un $\chi^2=5.2$; $p=0.074$ (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas del Locus APOE en población afrodescendiente de Buenaventura Valle del Cauca.

		Genotipo						Equilibrio H-W	
		E2/E2	E3/E3	E4/E4	E2/E3	E2/E4	E3/E4		Total
Población	(n= 348)	0,0000	0,5115	0,0603	0,1207	0,0345	0,2730	1,000	$p= 0.0744$
		Alelo 2		Alelo 3		Alelo 4		Total	
		0,0776		0,7083		0,2141		1,000	

Al realizar las comparaciones de las frecuencias alélicas entre la población de Buenaventura y las diferentes poblaciones de Colombia (Tabla 3), se encontraron diferencias significativas para el alelo E4 en los grupos poblacionales de Waunana, Tule, Yuco, Bogotá, Quindío, Medio Oriente, Valle del Cauca, Barranquilla. y Medellín ($p \leq 0,0345$). De igual forma se encontraron diferencias significativas para el alelo E2 en las poblaciones del Quindío, Oriente colombiano, Valle del Cauca y Barranquilla ($p \leq 0,0232$).

Tabla 3. Comparación de frecuencias alélicas del gen APOE entre diferentes poblaciones colombianas y la población de Buenaventura

Reference	Región	N	Alleles Observed (%)			p – Fisher test value		
			E2	E3	E4	E2	E3	E4
PE	Buenaventura	348	7,76	70,83	21,41	-	-	-
A	Providencia	29	8,62	70,71	20,69	0,6104	0,6504	0,5652
A	San Basilio	30	5,00	76,67	18,33	0,5900	0,8155	0,3589
A	Cauca	25	20,00	60,00	20,00	0,9865	0,1826	0,5445
A	Nuqui	30	6,67	73,33	20,00	0,5900	0,6899	0,5283
A	Bahía Solano	23	4,34	69,58	26,09	0,4666	0,5368	0,7847
A	Chocó	25	20,00	66,00	14,00	0,9865	0,4661	0,3578
A	Embera	25	0,00	86,00	14,00	0,1431	0,9877	0,3578
A	Waunana	30	0,00	91,67	8,33	0,5900	0,9994	0,0345
A	Tule	30	1,67	91,67	6,67	0,3261	0,9994	0,0345
A	Ijka	30	1,67	80,00	18,33	0,3093	0,9059	0,3589
A	Nukak	20	0,00	62,50	37,50	0,2088	0,3754	0,9478
A	Guahibo	26	0,00	80,77	19,23	0,1328	0,9115	0,5046
A	Kogí	30	0,00	90,00	10,00	0,0986	0,9966	0,0973
A	Coreguaje	28	0,00	58,95	41,05	0,1144	0,1845	0,9883
A	Butaregua	21	0,00	90,48	9,52	0,1935	0,9925	0,1474
A	Yuco	30	0,00	100,00	0,00	0,0986	1,0000	0,0010
B	Bogotá ^a	538	4,74	86,15	9,11	0,0508	1,0000	0,0000
C	Quindío	500	2,90	95,40	1,70	0,0016	1,0000	0,0000
D	Bogotá ^b	150	5,33	81,33	13,33	1,0000	0,9959	0,0199
E	Middle eastern	691	4,49	86,83	8,68	0,0232	1,0000	0,0000
F	Valle del Cauca	183	3,00	84,70	12,30	0,0134	0,9999	0,0068
G	Barranquilla	227	1,80	85,00	13,00	0,0010	1,0000	0,0071
H	Medellín	1001	7,50	81,40	11,10	0,4760	1,0000	0,0000

Jaramillo – Correa [A]; Forero^a [B]; Landázuri^b [C]; Tobar-Vargas [D]; Callas [E]; Rivera

[F]; Ruíz [G]; Vélez-Pardo; **[PE] Presente estudio.**

1.3 DISCUSION

Al estudiar Buenaventura, región Pacífico del Sur Occidente Colombiano, se suman factores como la localización geográfica, historia poblacional, etnicidad y composición genética de la población, lo cual influye en la distribución de frecuencias de APOE. Al igual que en otros países de América, Colombia es un país que presenta una gran variedad de poblaciones y etnias, siendo claramente apreciable tres grupos: los afro-descendientes, con un gran componente ancestral africano; los amerindios, descendientes de los antiguos pobladores de América; y los mestizos, producto de la mezcla entre amerindios, europeos y africanos. Sin embargo, existen variaciones en relación al componente étnico que predomina en cada región o población del país (Perdomo, 2013), lo que puede expresarse en diferencias en las distribuciones de alelos y genotipos de APOE, y por lo tanto en la susceptibilidad genética de cada una de estas poblaciones al desarrollo de desórdenes neurodegenerativos y metabólicos.

La población africana y sus descendientes se ha caracterizado principalmente por la alta frecuencia del alelo E4 en comparación con los demás grupos raciales, y el aumento considerable respecto al alelo E2 (Marcheco *et al.*, 2011). Al compararse estos grupos poblacionales, se debe tener en cuenta que como se trata de un único *locus*, estos agrupamientos son producto de la similitud en función de las altas o bajas frecuencias de estos alelos. Considerando que las poblaciones amerindias y afrodescendientes se caracterizan por presentar una mayor frecuencia de los alelos E4 y E2 que las mestizas, Jaramillo-Correa *et al.*, proponen que estas equivalencias pueden deberse a cuellos de botella o al aislamiento producido por su ubicación entre selva y zona baja de selva intervenida, como también a algún tipo de selección

a favor de estos alelos como consecuencia de su dependencia básica de la caza y de la pesca. La Isla Cascajal, donde se inició la población de Buenaventura, sufrió en la época de la colonia una serie de hechos trágicos que pudieron haber actuado como cuellos de botella en la población (fiebre amarilla, viruela, incendios, terremotos) (DANE 2005). La suma de estos eventos, junto al efecto fundador generado por los primeros asentamientos de los españoles, pudo haber cambiado las frecuencias alélicas para este gen, llegando a las conocidas actualmente: al igual que lo reportado para el gen de la globina cuyas variantes SS, AS y AA disminuyó en la población de Buenaventura en un número mejor de generaciones que lo esperado solo por acción de selección (Ortega *et al.*, 2015).

Los reportes de distribución de variantes APOE muestran altas frecuencias de E4 en Nigeria, África Sub-sahariana, Sudáfrica y los Inuit de Groenlandia (Huang *et al.*, 2017). Como consecuencia del origen africano de las comunidades negras colombianas traídas a América como esclavos durante el período de la conquista y la colonia (siglos XV-XIX) se explicaría la alta frecuencia de E4 observada en Buenaventura población que muestra puntualmente una semejanza genética con las poblaciones de Benín en África (Ortega *et al.*, 2015).

Las poblaciones de Providencia, Nuquí, San Basilio de Palenque y Bahía Solano presentaron frecuencias alélicas muy similares a Buenaventura y a las reportadas en poblaciones de la región occidental y centro de África, como Berma (Benín), Fang (Gabón), Bombare (Mali), Nigeria, Peul (Senegal), mientras que Chocó y Cauca con las frecuencias E2 más altas se asemejan más a las frecuencias de Malinke (Guinea) y de la costa este de África como Merina (Madagascar), Wentworth (Sur África), Tanzania, y Uganda (Perdomo, 2013) demostrando la heterogeneidad de zonas de donde fueron traídos los esclavos de África (Carvajal – Carmona *et al.*, 2000).

Aunque exista similitud en las frecuencias de APOE, no es correcto afirmar el mismo lugar de origen en África para estas poblaciones, dado que los eventos de mezcla dieron comienzo una vez los esclavos fueron traídos de África (Ortega *et al.*, 2015; Perdomo, 2013).

De igual manera, las poblaciones de Nukak y Coreguaje presentaron una frecuencia alta del alelo E4, proponiéndose que estas diferencias pueden deberse a cuellos de botella o al aislamiento producido por su ubicación entre selva y zona baja de selva intervenida, como también algún tipo de selección a favor del alelo E4 como consecuencia a su dependencia básica de la caza y la pesca. En poblaciones con dietas bajas en grasa como Nukak y Coreguaje, individuos portadores de alelos E4 podrían ser favorecidos por selección, debido a que estos alelos les permitirían mayores niveles de absorción de lípidos en el intestino, posibilitando el rebalanceo de colesterol en sus dietas (Corbo & Scacchi 1999).

La selección local, la estructura de las poblaciones y la deriva genética, son factores que pueden incidir en los resultados obtenidos. Otros factores como el aislamiento por distancia y la mezcla histórica también pueden haber influenciado significativamente la distribución de los polimorfismos de APOE en la población afrodescendiente de Buenaventura

La realización de estudios incluyendo diferentes variables fenotípicas, tales como niveles de colesterol y triglicéridos, tipos de alimentación, actividad física, IMC, etc., permitiría indagar acerca del papel que selección pueda ejercer sobre la prevalencia de diferentes variables APOE en las poblaciones. Nuestros resultados muestran la utilidad del locus APOE como un marcador antropogénico de susceptibilidad a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y/o

patologías recurrentes por alteración en el metabolismo de lípidos con especial énfasis en la población afrodescendiente.

1.4 CONCLUSIONES

La población de Buenaventura arrojó evidencia de como el locus APOE es un marcador que presenta respuesta biológica contemporánea a la diversidad genética poblacional, reflejándose esto en la mayor representatividad de los alelos E4 y E2 en poblaciones afrodescendientes.

La alta frecuencia del alelo E4 podría estar asociado con la alta incidencia de hipertensión e hipercolesterolemia, además de otras patologías crónicas en la población de Buenaventura.

A pesar de corroborarse que el marcador universal APOE es el E3, predominando en las poblaciones mundiales, la importancia de este estudio al resaltar para la población de Buenaventura una incidencia, con un 21% de la variante E4 y del 7% de la E2, radica en validar la hipótesis que procesos microevolutivos en estas poblaciones de origen africano pudieron alterar considerablemente sus frecuencias, haciéndolos indistinguibles desde el punto de vista genético.

Las poblaciones humanas de Colombia mostraron diferencias en la distribución alélica del locus APOE, entre poblaciones y frente a los reportes de frecuencias mundiales, dando evidencia que este marcador presenta una respuesta biológica contemporánea a la diversidad genética de las mismas.

Se espera que estos resultados permitan a los clínicos tener una valoración más real del riesgo de los pacientes a enfermedades como Alzheimer y del metabolismo del colesterol asociadas con alelos APOE en la población colombiana.

BIBLIOGRAFIA

Callas N; Poveda E; Baracaldo CM; Hernández P; Castillo C; Guerra M. (2017). Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en un grupo de Escolares del Centro-oriente colombiano: Comparación con las concentraciones plasmáticas de lípidos y apolipoproteínas. *Biomédica*; 27:526-36.

Carvajal-Carmona LG; Soto ID; Pineda N. et al. (2000). Strong Amerind/white sex bias and a possible Sephardic contribution among the founders of a population in northwest Colombia. *Am J Hum Genet* ;67:1287-95

Eisenberg DTA;Kuzawa CW; Hayes MG. (2010). Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history. *Am J Phys Anthro*; 143:100-11.

DANE. (2005). Boletín censo general 2005. Perfil Buenaventura. Recuperado de: <https://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL.PDF.CG2005/76109T7T000.PDE>

Excoffier, L, & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5. 2010. A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.* ; 10:564-7.

Forero DA; Pinzón J; Arboleda GH; Yunis JJ; Alvarez C; Cataño N; Arboleda H. (2006). Analysis of Common Polymorphisms in Angiotensin-converting Enzyme and Apolipoprotein E Genes and Human Longevity in Colombia. Archives of Medical Research; 37 (7): 890-894.

Hixson JE, Vernier DT. (1990). Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. J Lipid Res; 31:545-8.

Huang P, Hsieh SW, Chang YH, Hour AL, Chen HY, Liu CK. (2017). Differences in the frequency of Alzheimer's disease-associated genomic variations in populations of different races. Geriatr Gerontol Int ;17:2184-93.

Jaramillo-Correa JP; Keyeux G; Ruiz-Garcia M; Rodas C; Bernal J. (2001). Population Genetic Analysis of the Genes APOE, APOB (3'VNTR) and ACE in Some Black and Amerindian Communities from Colombia. Human Heredity; 52 (1): 14-33.

Landázuri P; Loango N, Gallego ML; Restrepo B. (2009). Diferencias de sexo, edad y lípidos plasmáticos asociadas al polimorfismo de la apolipoproteína E en un grupo de escolares de Quindío, Colombia. Biomédica; 29 (3): 381-391.

Marcheco B; Rodríguez JL; Mckeigue P. et al. (2011). Interactions between genetic admixture, ethnic identity, APOE genotype and dementia prevalence in an admixed Cuban sample; across sectional population survey and nested case-control study. BMC Med Genet; 12:43

Ortega DC; Fong C; Cárdenas H; Barreto G. (2015). Evidence of over-dominance for sickle cell trait in a population sample from Buenaventura. Colombia. *Int J GenetMol Biol.*; 7:1-7.

Perdomo. V.A. (2013). Análisis de Polimorfismos Asociados Al Gen de Apolipoproteína E y su Distribución en Poblaciones del Sur Occidente y Centro Colombiano. Tesis de Maestría. Cali-Colombia. Biblioteca Mario Carvajal, Universidad del Valle.

Rivera N; Perdomo VA; Barreto G. (2015). Polymorphic frequencies of the apolipoprotein E gene in Valle del Cauca. Colombia. *Rev Ciencias.*; 19:53-62.

Ruiz M; Arias I; Rolón G; Hernández E; Garavito P; Silvera-Redondo C. (2016). Análisis del polimorfismo del gen APOE en la población de Barranquilla. Colombia. *Biomédica*; 8:36-52.

Tobar-Vargas LF; Torres AL; Guerra M. (2009). Relación de la dieta con los niveles plasmáticos de lípidos y lipoproteínas en sujetos adultos con diferentes genotipos del gen de la apolipoproteína E. *Universitas Scientiarum*; 14:92-105.

Velez-Pardo C; Rojas W; Jimenez-Del-Rio M; Bedoya G. (2014). Distribution of APOE polymorphism in the “Paísa” population from northwest Colombia (Antioquia). *Annals of Human Biology*. DOI: 10.3109/03014460.2014.932846

CAPITULO II

2. ANÁLISIS DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS CON SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Resumen

El envejecimiento continuo de la población, como consecuencia del aumento en la expectativa de vida, ha sido asociado con un aumento en la incidencia de enfermedades crónicas tales como diabetes, cáncer, desórdenes cardíacos y neurológicos entre los cuales la Enfermedad de Alzheimer (EA) es el más común, representando del 50% al 70% de todos los casos de demencias. La genética de la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío es compleja debido a la naturaleza heterogénea de este trastorno. Entre los factores de riesgo más importantes para la EA se encuentran genes que se expresan en vías metabólicas relacionadas con el sistema nervioso. Aunque el gen APOE, y, específicamente su variante APOE*4 representa el factor de riesgo genético más fuerte para la EA, los estudios genético moleculares han identificado más de 30 loci adicionales, donde cada uno aporta un efecto relativamente pequeño. Los loci conocidos asociados con EA explican solo alrededor del 30% de la variación génica, por lo tanto, gran parte de esta gama de variantes genéticas permanece sin identificación y sin explicación.

Con el objetivo de caracterizar genes asociados a susceptibilidad de Enfermedad de Alzheimer (forma esporádica) y alteración metabólica, este capítulo se basó en el estudio de variantes patogénicas con carga mutacional de impacto proteico, halladas en los genes de pacientes con Alzheimer. El APOE como gen crucial fue analizado junto a otras moléculas donde fue validado su efecto como biomarcadores potenciales en el diagnóstico de Alzheimer para población colombiana.

En total fueron secuenciados 14 exomas (10 de pacientes con EA y 4 controles – personas sin diagnóstico de EA). Los 10 pacientes fueron caracterizados previamente para el gen APOE a objeto de asegurar la presencia de la variante APOE4 al menos en heterocigosis.

Fueron clasificados 537 genes con variación patogénica, de los cuales 150 fueron representados en los exomas de pacientes estudiados. Los diferentes métodos de enriquecimiento bioinformático como el ClinVar (Variantes Clínicamente Relevantes) y la base de datos funcional KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), determinaron que vías o procesos importantes relacionados al desarrollo o progresión de Alzheimer, podrían estar involucrados con estos genes. Al caracterizar estas biomoléculas se obtuvo conocimiento sobre las funciones etiológicas en la enfermedad. La presencia de múltiples genes activos en cerebro, sangre y demás tejidos, puede proporcionar la explicación mediante la cual la acumulación de amiloide- β desencadena la etiología patológica. Todos estos análisis permitieron identificar regiones de susceptibilidad genética asociada a marcadores metabólicos en la población con enfermedad de Alzheimer y también, que no se halla un solo gen responsable de la aparición de Alzheimer, sino de grupos de genes que inciden en múltiples vías que al final desencadenan la patología.

Palabras claves: Enfermedad de Alzheimer, APOE, Secuenciación de Exoma, metabolismo, Enfermedad crónica.

Abstract

The continuous aging of the population due to the increase in life expectancy, has been associated with an increase in the incidence of chronic diseases such as diabetes, cancer, cardiovascular and neurological disorders among which Alzheimer's disease (AD) is the most common, representing 50% to 70% of all dementia cases. The genetics of late-onset Alzheimer's disease is complex due to the heterogeneous nature of this disorder. Among the most important risk factors for AD are genes that are expressed in metabolic pathways related to the nervous system. Although the APOE gene, and specifically the APOE*4 variant, represents the strongest genetic risk factor for AD, molecular genetic studies have identified more than 30 additional loci, each of which has a relatively small effect. Known loci associated with AD explain only about 30% of gene variation, therefore much of this range of genetic variants remains unidentified and unexplained.

With the aim of characterizing genes associated with susceptibility to sporadic Alzheimer's disease and metabolic alteration, this chapter was based on the study of pathogenic variants with protein impact mutational load, found in the genes of Alzheimer's patients. APOE as a crucial gene was analyzed together with other molecules where its effect as potential biomarkers in the diagnosis of Alzheimer's for the Colombian population was validated. In total, 14 exomes were sequenced (10 AD patients and 4 controls – people without a diagnosis of AD). The 10 patients were previously characterized for the APOE gene to ensure the presence of the APOE4 variant, at least in heterozygosity. 537 genes with pathogenic variation were classified, of which 150 of them were represented in the exomes of the studied patients. The different bioinformatics enrichment methods such as ClinVar (Clinically Relevant Variants) and the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) functional database, determined which pathways or processes related to the development or progression of Alzheimer's could be involved with these genes. By characterizing these

biomolecules, knowledge was obtained about the etiological functions of the disease. The presence of multiple active genes in the brain, blood, and other tissues may provide the explanation by which the accumulation of amyloid- β triggers the pathological etiology. All these analyzes made it possible to identify regions of genetic susceptibility associated with metabolic markers in the population with Alzheimer's disease,

Key Words: Alzheimer Diseases, APOE, Exom Sequency, Chronic Metabolism Diseases.

Introducción

La Enfermedad de Alzheimer (EA) como patología compleja, ha generado un sin número de investigaciones enfocadas desde el plano clínico, fisiológico, molecular, genético, psiquiátrico, etc. Resultados que han direccionado a la comprensión de las diferentes vías que inciden en la enfermedad, así como genes categorizados con umbrales definidos en la biología anormal y funcional que desencadenan el problema a abarcar.

Hasta la fecha, no existen tratamientos curativos para pacientes que ya tienen EA, y los tratamientos disponibles solo son capaces de retrasar la progresión de la enfermedad. La EA se clasifica en dos tipos según la edad de inicio: EA de inicio precoz (EAIP), diagnosticada en personas <65 años, y EA de inicio tardío (EAIT), diagnosticada en personas ≥ 65 años (Scarmeas et al., 2006). La EAIP representa hasta el 5% de todos los casos de EA, la mayoría de los cuales son causados por raras mutaciones autosómicas dominantes en uno de tres genes: proteína precursora de amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) (Gamba et al., 2019). La mayoría de los casos de EA son EAIT esporádicos, un trastorno heterogéneo con interacciones complejas entre factores de riesgo genéticos y ambientales, que están influenciados por múltiples variantes comunes con tamaños de efecto bajos (Liu et al., 2020; Peng et al., 2020). Las estimaciones de la heredabilidad genética de EAIT oscilan entre el 60% y el 80% (Zarrouk et al., 2018). El polimorfismo $\epsilon 4$ en la proteína codificada por el gen de la apolipoproteína E (APOE), ubicado en el cromosoma 19, se considera el factor de riesgo genético más importante para la EAIT (McGuinness et al., 2018). Sin embargo, el efecto *APOE* $\epsilon 4$ representa solo el 27,3 % de la heredabilidad general (Fassbender et al., 2001), y permaneciendo una gran proporción de la heredabilidad sin explicación.

Entre los factores de riesgo modificables de la EA, la diabetes, la obesidad, la hipertensión y el hipercolesterolemia pueden controlarse mediante una dieta saludable, actividad física regular y

entrenamiento cognitivo. En particular, una dieta rica en grasas saturadas y carbohidratos simples aumenta el riesgo de demencia y una dieta subóptima se asocia con un deterioro cognitivo más grave en la EA (Fieldhouse et al., 2022), mientras que la dieta mediterránea se correlaciona con un mejor estado cognitivo en personas sanas con un riesgo reducido de desarrollo de la patología (Scarmeas et al., 2006).

Evidencias experimentales y clínicas indican que los trastornos neurodegenerativos a menudo se asocian con disfunción metabólica (Gamba et al., 2019), que puede empeorar los síntomas neurológicos (Peng et al., 2020). El deterioro del metabolismo cerebral del colesterol ocurre tanto en el envejecimiento como en la EA (Liu et al., 2020; Zarrouk et al., 2018) y los agentes hipolipemiantes se han asociado con un menor riesgo de desarrollar EA (McGuinness et al., 2010; Fassbender et al., 2001; Wolozin et al., 2000), pero la forma mediante la cual son transportados de metabolitos producidos en sangre, sean estos en forma de ácido grasos, lípido, azúcar y demás, continúan siendo tema de discusión en la forma mediante la cual se abarcan los estudios genómicos de esta patología.

La complejidad de la interacción de los diversos factores genéticos y ambientales hacen imposible predecir si una persona va a presentar o no la Enfermedad de Alzheimer con base en factores genéticos (Farrer, 2022). En la actualidad se reconoce que la formación de metabolitos secundarios y la misma sinergia existente entre los diferentes genes que inciden de manera significativa en la manifestación de patologías previas al desarrollo del Alzheimer, tales como la diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia, artritis, multiparidad, estilo de vida, etc. pueden atribuir especificidad y jugar un rol fundamental en la biología anormal del cerebro.

A pesar de esto, las enfermedades neurodegenerativas tienen muchos vacíos en el conocimiento por la falta de investigaciones que tengan en cuenta la población colombiana con EA y los diversos factores de riesgo genéticos y metabólicos encontrados en otras poblaciones a nivel mundial, ítem que se ha subrayado reiteradamente, y que solo pocos estudios han tomado en cuenta.

En este contexto se hipotetiza que los genes o marcadores genéticos obtenidos tanto en pacientes con Alzheimer como en controles sanos (sin demencia) puedan tener un papel clave en el control del estado oxidativo, neuroinflamatorio, alteración de receptores membranales y demás, conllevando a cambios substanciales en el metabolismo de glúcidos y lípidos, fuentes biológicas esenciales en la homeostasis neuronal.

Específicamente, esta investigación tuvo como objetivo conocer los cambios desde el ambiente celular a nivel de exoma de una muestra de pacientes con Enfermedad de Alzheimer y de esta manera identificar genes candidatos implicados en la patología, que se puedan proponer como objetivos blanco en futuros estudios.

El conocimiento generado de la presente investigación es un aporte a la generación de datos moleculares direccionados a comprender esta compleja enfermedad, representando información accesible a la comunidad médica y científica como fuente de apoyo diagnóstico y pronóstico a pacientes con síndrome metabólico, fenotipos característicos de pacientes con susceptibilidad a la Enfermedad de Alzheimer.

2.1 Generalidades de la enfermedad de Alzheimer

Hoy, uno de cada ocho adultos mayores en América (>65 años de edad) están afectados por la Enfermedad de Alzheimer (EA), generando un costo anual de más de 200 mil millones de dólares (Rovner, 2020). Se estima que cerca de 13,5 millones de personas en Estados Unidos tendrán

Alzheimer para el 2050, datos que para población latinoamericana es desestimado, dado que el 75% o más de las personas con demencia no son diagnosticadas y se cree que esa tasa aumentará hasta el 90% en algunos países de ingresos bajos y medios (World Alzheimer Report, 2022).



Figura 2. Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer según el World Alzheimer Report, 2022.

La población colombiana de 60 años o más, representa el 12% de la población total, esperándose para el 2050 el doble de esta proporción (DANE 2022). En paralelo, el aumento y carga de enfermedades crónicas, principales formas de base al desarrollo de Alzheimer, convirtiendo el envejecimiento en un problema de salud pública.

Sumado a ello, características relacionadas con una mayor susceptibilidad a la enfermedad son la etnicidad, el sexo, traumatismo craneoencefálico, enfermedades cardiovasculares, historia familiar

de Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2, epilepsia y depresión (Alzheimer's Association, 2019; Edwards *et al.*, 2019; Eid *et al.*, 2019). Diferentes aspectos del estilo de vida también hacen parte de los factores de riesgo modificables para la EA que al ser evitados disminuyen la probabilidad de desarrollo de la misma y comprenden aspectos como: ausencia de actividad física, dieta, tabaquismo, alcoholismo y exposición a pesticidas (Tabla 4), (Edwards *et al.*, 2019; Eid *et al.*, 2019).

Tabla 4. Factores de riesgo potenciales al desarrollo de Alzheimer. Tomado de Livigston *et al.* (2017)

Tabla. Factores de riesgo de demencia y enfermedad de Alzheimer conocidos			
		Modificable	No modificable
Demográficos	Edad		x
	Sexo		x
	Escolaridad	x	
Genéticos	PSN1, PSN2, ApoE ε4		x
Médicos	Diabetes	x	
	Obesidad	x	
	Hipertensión	x	
	Pérdida de audición	x	
	Depresión	x	
Estilo de vida	Tabaco	x	
	Alcohol	x	
	Actividad física	x	
	Dieta	x	
	Actividad intelectual	x	
	Interacción social	x	
Reducción del riesgo atribuible		35%	65%

Este panorama de incidencia y susceptibilidad previo al envejecimiento, implica e hipotetiza que los genes o marcadores moleculares analizados a partir de poblaciones con Alzheimer esporádico, presentan un papel clave en el control del estado oxidativo, neuroinflamatorio y del metabolismo de glucosa y lípidos, permitiendo avances en conocer como las vías que controlan los niveles de lípidos, esteroides y sus metabolitos indican una importante implicación en la enfermedad (Hsieh et al., 2023).

En este caso, la sincronía de la homeostasis humana, lleva a que los niveles de colesterol y demás metabolitos secundarios producidos por las células, sean punto clave de investigación para conocer los mecanismos de vías de regulación necesarias para los distintos factores de transcripción, proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides, receptores hepáticos y el gen de la apolipoproteína E, elementos de respuesta y modulación en tejidos diferenciales (Gamba et al 2019), coordinando o descoordinando función celular en niveles de expresión génica involucrada en proceso y transporte de colesterol y ácidos grasos al cerebro (Husain et al., 2021).

2.2 Alzheimer; principios genéticos y moleculares

La enfermedad de Alzheimer como patología multifactorial involucra factores de riesgo poligénicos. Los análisis genómicos de alto rendimiento, como los estudios de asociación, han identificado más de 40 genes asociados con la EA. El análisis de redes revela que la mayoría de estos genes están involucrados con procesos biológicos involucrados en la glía y las neuronas, incluida la producción, agregación, degradación y eliminación de A β , así como el metabolismo de los lípidos y la respuesta inmunitaria innata (Tanzi, 2022). Algunos de estos genes también desempeñan funciones críticas en la regulación de la sinaptogénesis, las funciones sinápticas y la plasticidad sináptica. La

expresión desregulada y las funciones alteradas de estas proteínas pueden contribuir al deterioro temprano de las funciones sinápticas en la EA antes de que se presenten los síntomas clínicos.

Los genes asociados con la EA que se han implicado en las funciones sinápticas, Figura 2., son discutidos como factores de riesgo genéticos con prevalencia y validación para el Alzheimer tipo tardío, donde se incluyen genes como *SORL1*, *BIN1*, *PICALM*, *CD2AP*, *CLU*, *PTK2B*, *APOE* y *TREM2*. De igual manera, factores de riesgo genéticos cuyas actividades desreguladas son sugeridas e involucradas en la disfunción sináptica en la EA, incluidos *LILRB2*, *IL33* y *ADAM10*.

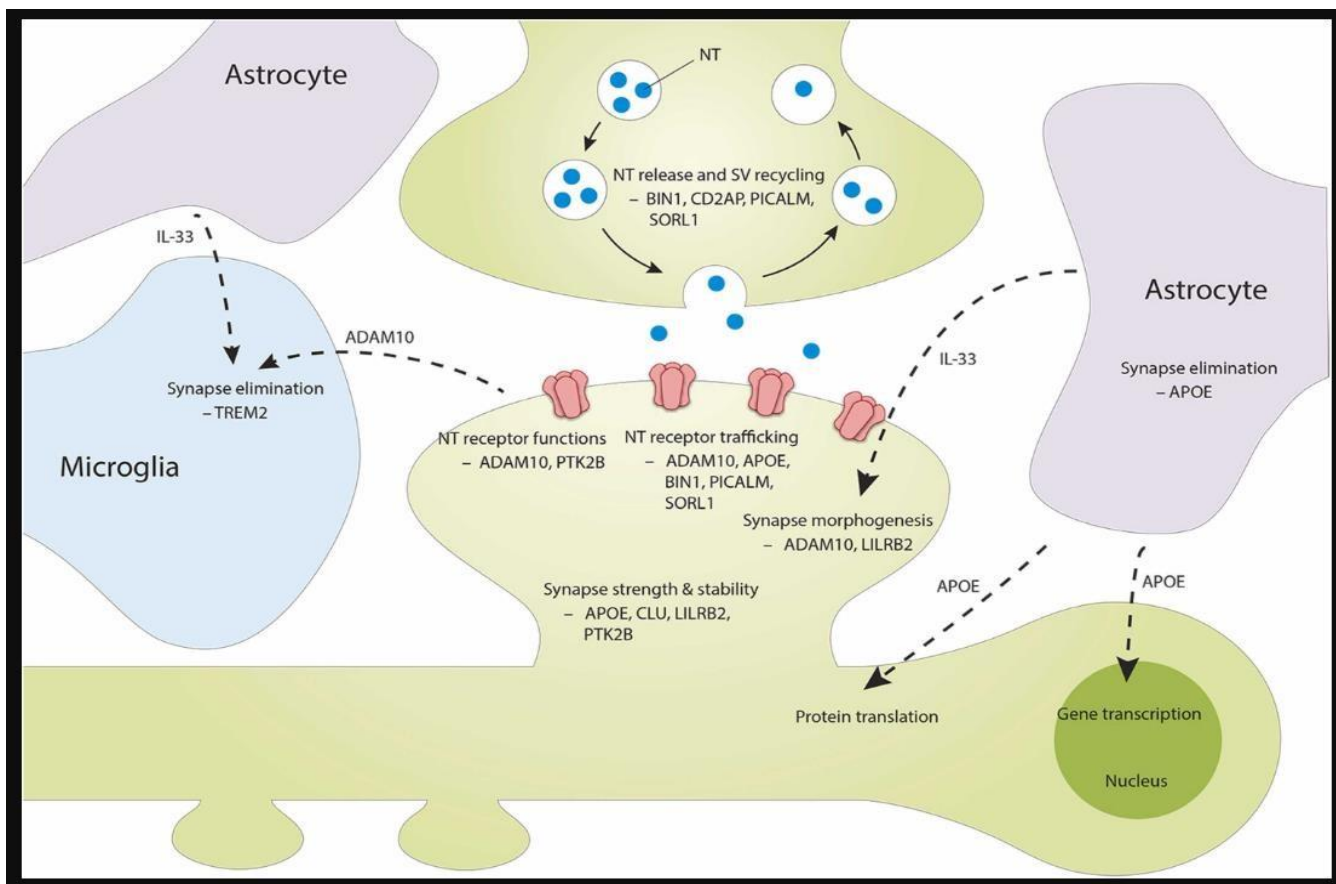


Figura 3. Factores de riesgo genéticos prevalentes o validados para la forma tardía del Alzheimer.

La figura evidencia los factores sinápticos de riesgo genético asociados con la enfermedad. Estos genes/proteínas mencionados en el párrafo anterior, están implicados en la morfogénesis de las sinapsis, así como en el fortalecimiento y la estabilidad sináptica. Tienen funciones reguladoras en la liberación de neurotransmisores (NT) y el reciclaje de vesículas sinápticas (SV) en las terminales presinápticas, y regulan el tráfico y las funciones de los receptores de NT en las especializaciones postsinápticas. También modulan la expresión de proteínas sinápticas alterando la transcripción de genes y la traducción de proteínas en las neuronas. Además, algunos de estos factores se expresan de forma destacada en las células gliales (es decir, microglia y astrocitos) para modular la conectividad sináptica mediante la regulación y eliminación de la misma (Wing-Yu, 2023).

Al conocerse que muchas moléculas intervienen en la forma mediante la cual las diferentes isoformas de genes con importancia biológica, sean estos tipo transportadores, señalizadores y/o involucrados en procesos cruciales del ambiente celular, los genes clasificados en el presente estudio, muestran dinámicas que en gran parte no presentan interconexión genómica, pero que al analizar los modelos de regulación de biosíntesis de metabolitos secundarios se puede observar que podrían activar la expresión de genes involucrados en la captación, salida, transporte y excreción de estos importantes metabolitos (lípidos, glucosa, carbohidratos, ácidos grasos, purinas, pirimidinas, etc.) en múltiples tejidos, los cuales pueden estar modulando respuesta inmunitaria innata y adaptativa, procesos de inflamación, impacto positivo o negativo en la homeostasis de cómo estos genes, generan sinergia en la producción del péptido beta amiloide ($A\beta$), principal proteína involucrada en la formación de placas amiloides en cerebros enfermos con Alzheimer.

Todo metabolito en estado de oxidación especialmente los lipoproteicos, pueden atravesar la barrera hematoencefálica, siendo la forma como interaccionan las variantes mutadas o normales de los genes estudiados en la homeostasis del cerebro. A partir de esta fisiología los diferentes activadores y

reguladores desempeñan el papel crucial y fundamental de proveer equilibrio o armonía en el sistema nervioso.

2.3 Otros marcadores moleculares en el Alzheimer

Además del impacto de genes mayores que aceleran la patología, por ser su gran mayoría genes receptores, surgen otros factores genéticos que involucran no solamente la incidencia o afectación sobre la célula, sino que el efecto bajo o “menor” sumado a la interacción con otras moléculas desencadena sinergismo, haciendo mucho más complejo entender exactamente que provoca el estadio final de la enfermedad.

Dentro de estos elementos biológicos se encuentran proteínas de señalización, receptores de citoquinas o demás moléculas con respuesta inflamatoria, inhibidores del ciclo celular, etc.

En la figura 3 y 4, se observan modelos de incidencia génica tanto de vías de regulación como factores involucrados. Estos genes adicionales que podrían estar involucrados en la EA de inicio tardío, generan sobreexpresión de las células mieloides, principales formadoras de placas y ovillos amiloides (Rudolph, 2022).

La identificación de nuevos genes es importante para una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos que conducen a la neurodegeneración. Dado que los diagnósticos diferenciales de los trastornos neurodegenerativos son difíciles, especialmente en las primeras etapas, las pruebas genéticas son esenciales para los procesos de diagnóstico.

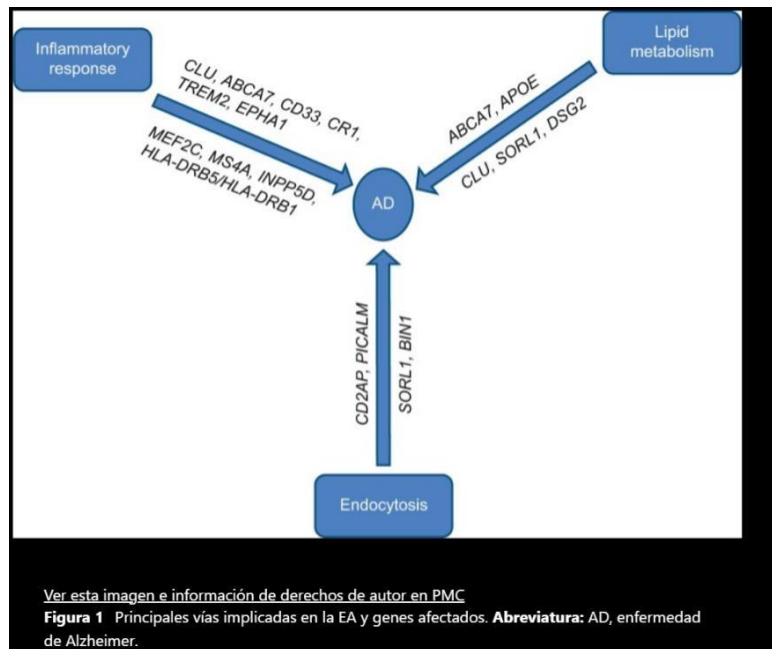


Figura 4. Principales vías implicadas en la EA y genes afectados. (Giri, 2016)

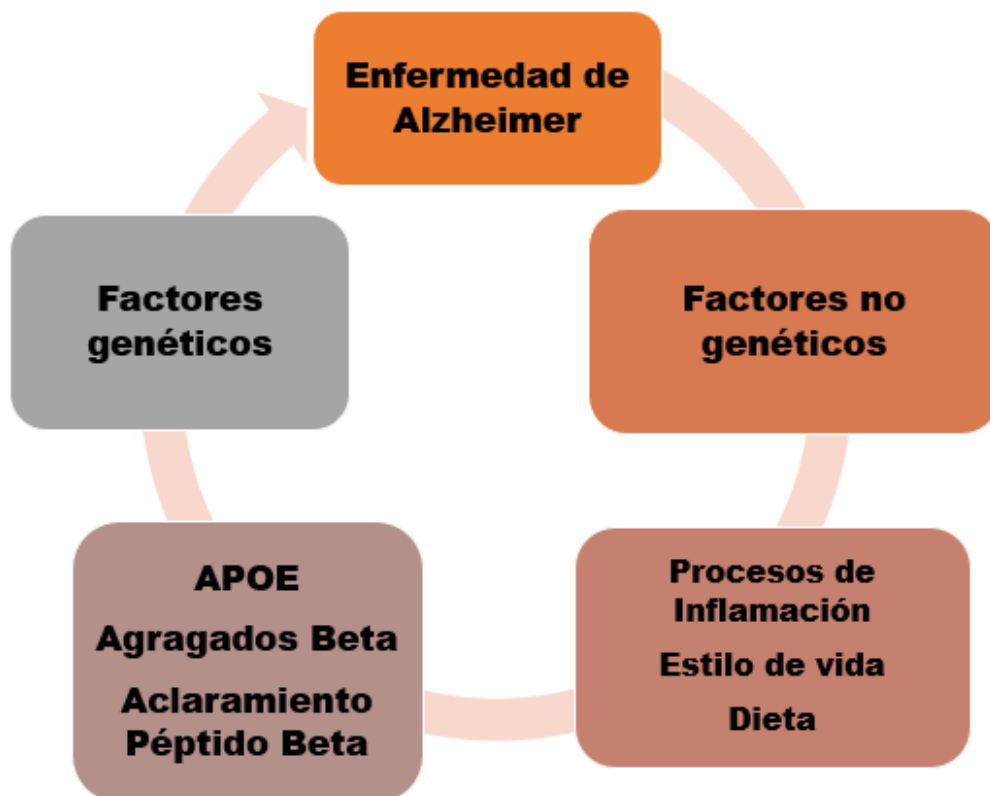


Figura 5. Factores que involucran el Alzheimer tardío. (Giri, 2016)

En Colombia a nivel poblacional, es poco lo que se conoce acerca de cómo estos receptores mediados por variantes polimórficas pueden influir sobre los efectos tóxicos que involucran el péptido β -amiloide. Recientemente Dong & colaboradores, 2022, reportaron la presencia del alelo G del gen ABCA1 y la isoforma E4 de APOE como factores de riesgo a la enfermedad de en población brasileña con perfiles lipídicos, concluyendo que existe una sinergia que contribuye a la demencia cuando se encuentran presentes ambas variantes.

Estos polimorfismos han sido ampliamente estudiados en relación con el riesgo de EA entre otros fenotipos, en particular los relacionados con las enfermedades cardiovasculares y lípidos plasmáticos (Kim, 2022). Esta variante puede influir en los niveles de marcadores enzimáticos y demás mecanismos de señalización celular.

Se requiere de mayor esfuerzo al estudio de estas variantes, dado a que la asociación con la aparición tardía de la enfermedad debe ser vista desde un panorama más robusto, donde la influencia de cada uno de los genes involucrados en el enorme caos molecular del Alzheimer esporádico puede ser el resultado de la estructura genética de las poblaciones y la interacción de esta con el ambiente.

Los objetivos del capítulo II tienen como objetivo la caracterización de regiones y variantes genómicas asociadas con la susceptibilidad al desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer, lo cual permitió a partir de métodos de secuenciación de exomas, determinar variantes génicas como potenciales biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad.

De igual manera cubrir vacíos de información existentes respecto a la población colombiana, dado a que se desconoce qué factores genéticos y ambientales pueden estar influyendo en la calidad de vida de la población desde el punto de vista metabólico, procesamiento y transporte de moléculas con impacto alto, medio o bajo en vías que se encuentran involucradas en patologías tan complejas como

la enfermedad de Alzheimer. De igual manera, entender el rol de genes con función metabólica y que, desde el punto de vista de su ambiente genómico, pueden permitir dar una posible explicación acerca de que variaciones encontradas en el genoma de estos individuos conferirá mayor susceptibilidad a la patología y cómo podría generarse una explicación celular y molecular del desarrollo de la enfermedad permitiendo plantear blancos terapéuticos. Además, es importante para el establecimiento de patrones que permitan dilucidar el comportamiento de estas variantes de ADN y así establecer relaciones y explicaciones que ayuden a evaluar la utilidad de estos genes en un contexto clínico, psicológico, evolutivo y antropológico.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis *in silico* de este capítulo fueron realizados en la Universidad del Valle y en la Universidad Javeriana – Cali. La fase de genotipificación de muestras, fue desarrollada en el Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle.

2.4.1 Caracterización fenotípica de la población de estudio

Teniendo en cuenta el estudio reportado por SABE Colombia 2015 - 2020, el Ministerio de Salud y protección Social y Colciencias, quienes desarrollaron a través de la Unión Temporal SABE, conformada por diversos grupos de investigación de la Universidad del Valle y la Universidad de Caldas, con la colaboración del Centro Nacional de Consultoría (CNC), una encuesta de **23.694** personas en hogares de zonas urbanas y rurales del país midiendo los determinantes del envejecimiento activo en población de adultos mayores. Esta encuesta mostró como después de la hipertensión arterial, los problemas relacionados con la depresión y las enfermedades psiquiátricas son los que más afectan a la población encuestada. Adicionalmente, el deterioro visual y auditivo

como factores que afectan y determinan la discapacidad, conjugadas con violencia, maltrato, desplazamiento y condiciones de vida que determinan el estado salud de los adultos mayores en el país.

La encuesta SABE arrojó datos socioeconómicos, del entorno físico y social, de la conducta, la cognición y el afecto, la funcionalidad, el bienestar mental, las condiciones médicas y de salud, así como el uso y acceso a servicios de salud.

SABE hace parte del Sistema Nacional de Estudios y Encuestas Poblacionales para la Salud, del Ministerio de Salud y Protección Social (SNEEPS) (SABE Colombia, 2015).

En las tablas 1 y 2 se muestran las patologías con mayor afectación al proceso de envejecimiento y los hábitos que generan efecto sobre el riesgo a la enfermedad de Alzheimer.

Tabla 5. Patologías asociadas al desarrollo de Alzheimer. Información tomada del SABE Colombia 2015 - 2020

Patología Asociada a EA	%	Hombres	Mujeres
Hipertensión	60.7%		▪
Diabetes	18.5%		▪
Problemas articulares	25.8%		▪
ACV	14.5%	✓	✓
Osteoporosis	11.8%		▪
Enfermedad pulmonar	11.4%	✓	✓

ECV	4.7%	✓	✓
Deterioro Cognoscitivo Leve (DCL).	17.5%		▪
síntomas depresivos	41.0%		▪

% prevalencia en el envejecimiento

ACV (accidente cardio vascular)

ECV (enfermedad cerebro vascular)

- Mayor frecuencia

✓ Igual

Tabla 6. Hábitos de riesgo para Alzheimer. Tomado del SABE Colombia 2015 - 2020

Hábitos que generan efecto en riesgo a la EA	% consumidores	Hombres	Mujeres
Consumo de alcohol	14%	▪	
Tabaquismo	12%	▪	
Sedentarios	(45,2%-67,0%)	✓	✓

Estas variables fueron tomadas a partir de revisión exhaustiva e historias clínicas suministradas con permiso previo por la Fundación Alzheimer de Cali, institución encargada del diagnóstico de los pacientes. Información como datos demográficos, evaluación neurológica, neuropsicológica, genealogía, estadio de la enfermedad y aplicación de los criterios de inclusión y exclusión (tablas 7 y 8), fueron proporcionados por esta entidad en colaboración, la cual contó con el equipo de trabajo profesional en áreas terapéuticas y de cuidado: Valoración Médica, Evaluación Neuropsicológica, Terapia Física, Terapia del Lenguaje y de la Deglución, Terapia Ocupacional, Terapias Artísticas (Pintura y Música), Risoterapia, Estimulación Cognitiva, Terapias de Medicina China Alternativa y Psicología. Cada participante contó con el aval de los miembros de su familia y/o persona encargada, a quienes se les brindó toda la información respecto a implicaciones, riesgos y beneficios. En el caso de individuos sin diagnóstico de demencia y quienes participan como eje control, fueron compuestos por empleados, trabajadores y docentes de la Universidad del Valle con edades entre 30 y 50 años, saludables, sin deterioro cognitivo ni quejas de memoria determinado por evaluación médica y/o neuropsicológica, mestizos y sin parentesco familiar.

La investigación contó con el aval del Comité de Ética en Investigación en Salud de la Universidad del Valle con código 242-018 (Anexo 1).

Tabla 7. Criterios de inclusión

Pacientes	Controles
Población del sur occidente de Colombia	
Sin antecedentes de familia con demencia	Sin antecedentes de familia con demencia

Individuos con deterioro cognitivo compatible con criterios diagnósticos del DSM-IV para Enfermedad de Alzheimer.	Individuos sin deterioro cognitivo ni quejas de memoria, deterioro en evaluación médica y/o neuropsicología
Evaluación médica y neuropsicológica que documente el deterioro cognitivo y las quejas de memoria	

Tabla 8. Criterios de exclusión

Pacientes	Controles
Individuos con manifestaciones neurológicas o antecedentes personales y/o familiares de otras enfermedades neurológicas	
Individuos con deterioro cognitivo compatible con criterios diagnósticos del DSM-IV para la enfermedad de Alzheimer, con historia familiar con demencia	

2.4.2 Procesamiento de muestras y tipificación de APOE en pacientes

Dado a que las frecuencias polimórficas del gen APOE, no habían sido descritas antes en pacientes con Alzheimer y tampoco en población del Valle del Cauca, fue necesario realizar su evaluación con el fin de determinar la proporción de alelos E4 en estos casos.

Para ello, la tipificación y determinación alélica de APOE, se llevó a cabo con la metodología empleada en el capítulo I, amplificando el exón 4 del gen APOE mediante la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP's). La frecuencia de las variantes fue determinada por conteo directo. Mediante la prueba exacta de Fisher se evaluó la independencia entre los genotipos APOE, casos y controles; asimismo y haciendo uso de datos reportados recientemente en otras dos ciudades de Colombia, se evaluó la independencia de las frecuencias genotípicas y alélicas APOE de pacientes afectados con Alzheimer y su ubicación geográfica. Finalmente se calcularon los OR de genotipos y alelos APOE para valorar la susceptibilidad otorgada por las variantes a desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

Es importante mencionar que el estado de homocigosis o heterocigosis del alelo APOE, fue determinante para poder seleccionar aquellos pacientes con al menos una copia del alelo E4 y que fuese indicado para exoma.

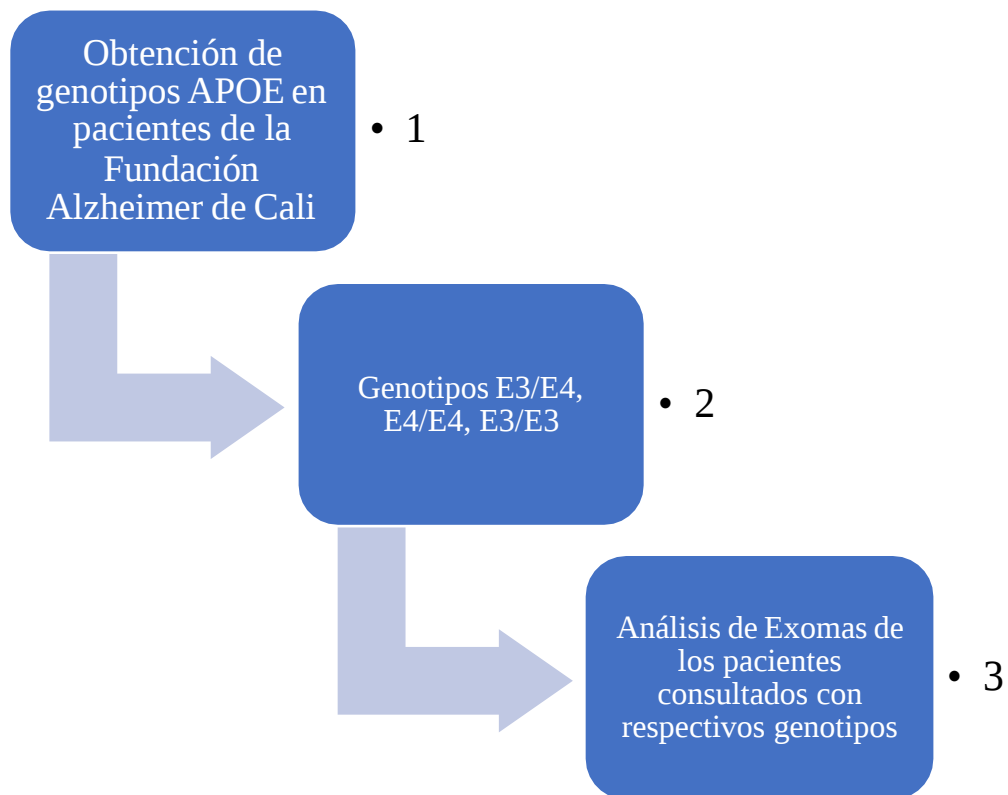


Figura 6. Paso a paso del análisis de las muestras de pacientes y controles.

2.4.3 Análisis Bioinformático de Éxomas

El procedimiento bioinformático básico del análisis de secuenciación de exoma total (WES) compromete los siguientes pasos principales: Evaluación de Calidad de datos crudos pre procesamiento, mapeado, procesamiento post-alineación y análisis de la variante.

2.4.4 Evaluación de Calidad de Datos Crudos y Preprocesamiento

La calidad de los datos crudos de las secuencias obtenidas por Macrogen, se evaluó empleando el programa FastQC 0.11.2, el formato FastQ incorpora los puntajes de calidad de base según la escala de Phred para facilitar la evaluación de la calidad de la secuencia (Bao et al., 2014), de acuerdo al

reporte de MacroGen, las lecturas de las secuencias se encontraban sin adaptadores, por lo que el paso de eliminar los adaptadores no fue necesario.

2.4.5 Análisis de la Variante

El análisis de variantes consiste en: llamado de la variante, anotación y priorización. Los diferentes programas de llamado de variantes pueden identificar diferentes polimorfismos, ya que cada uno de estos programas utiliza diferentes modelos para llamar dichos polimorfismos. Esto se ha documentado en aplicaciones clínicas, donde los resultados falsos positivos y falsos negativos tienen implicaciones críticas para la atención y el diagnóstico del paciente (O’Rawe et al., 2013; Pabinger et al., 2014).

El algoritmo FreeBayes que fue el empleado para definir las variantes importantes o significativas teniendo en cuenta de que no se usaron muchos parámetros por defecto en los algoritmos sino los que proporcionarían contundencia en cambios significativos o variantes significativas en el genoma y éste es un algoritmo que lo permite. Hay muchos algoritmos, pero dado a que se tiene una enfermedad altamente heterogénea y compleja en términos genéticos o de susceptibilidad se requieren métodos mucho más precisos que los genéricos o estándar para poder dar certeza en la identificación e imputación de las variantes.

SAMtools y GATK identifican variantes en función de cómo se alinean las lecturas al genoma de referencia, teniendo en cuenta que secuencias idénticas pueden tener múltiples posibles alineaciones a la de referencia, Freebayes en su lugar identifica los SNP en función de la combinación más probable de genotipos en cada posición en la referencia (Garrison y Marth, 2012). Tanto Freebayes como GATK usan métodos bayesianos para modelar el error de secuencia. SAMtools aplica un mapeo oculto de Markov y calidad de ensamblaje (MAQ) para estimar el error (Liu et al., 2013).

SAMtools y Freebayes se caracterizan por su simplicidad y flexibilidad de uso, mientras que GATK, realiza pasos adicionales, dentro de los que se incluyen una realineación local, lo cual mejora la alineación alrededor de los indels, eliminando efectivamente cambios de marco que de otro modo generarían llamadas de SNPs falso positivos (Polyanovsky et al., 2011).

Además, aunque las tres herramientas usan puntajes de mapeo, GATK puede aplicar una variante de recalibración del nivel de calidad a grandes conjuntos de datos, lo cual ayuda a distinguir verdaderos SNP de artefactos de procesamiento de datos (McKenna et al., 2010).

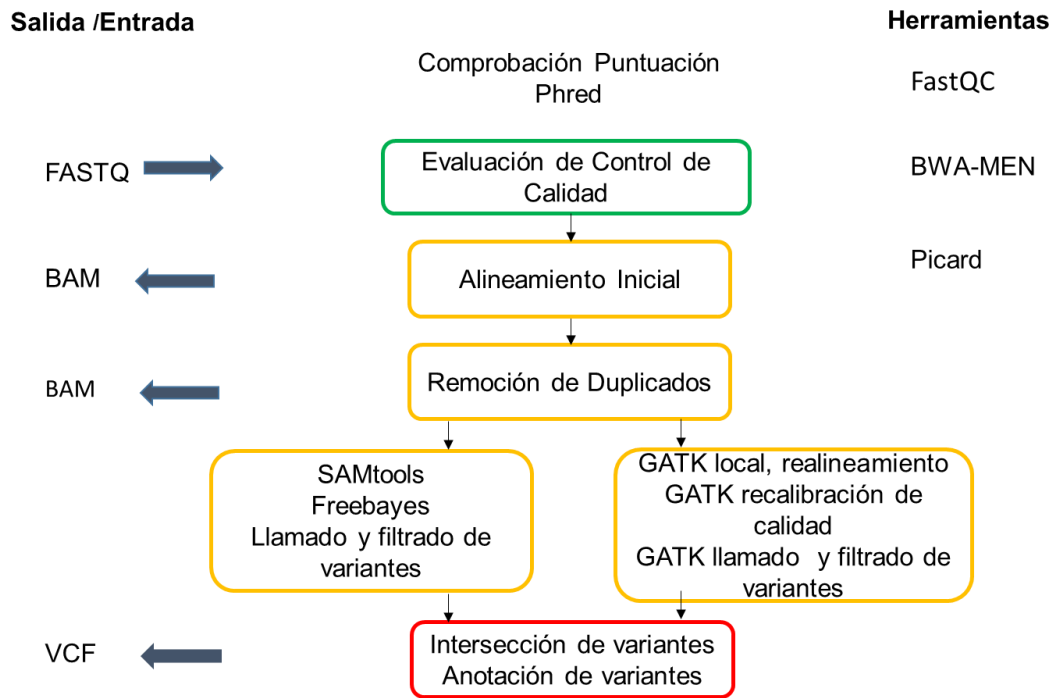


Figura 7. Esquema del flujo de trabajo de SeqMule y herramientas usadas en cada paso.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Características fenotípicas encontradas en los pacientes con Alzheimer

La población con diagnóstico de Alzheimer presentó dentro del cuadro clínico encontrado, fuertes patologías que con la edad se hipotetizan como promotoras de este desorden neurodegenerativo.

La figura 8, muestra enfermedades encontradas entre los pacientes con la EA y aspectos de su estilo de vida. Las patologías más prevalentes fueron: hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes, encontradas en más del 40% de los individuos. Por el contrario, la enfermedad coronaria, accidente cerebro vascular (ACV), traumatismo craneoencefálico (TCE), pérdida de la conciencia, enfermedad osteoarticular, anoxia e hipoxia fueron menos comunes, presentándose en menos del 20% de la muestra. Por otro lado, los estilos de vida con una frecuencia mayor al 40% entre pacientes con EA son el sedentarismo, tabaquismo y consumo de alcohol, mientras que la obesidad y la nuliparidad se encuentran entre el 30% y 15 % de los casos.

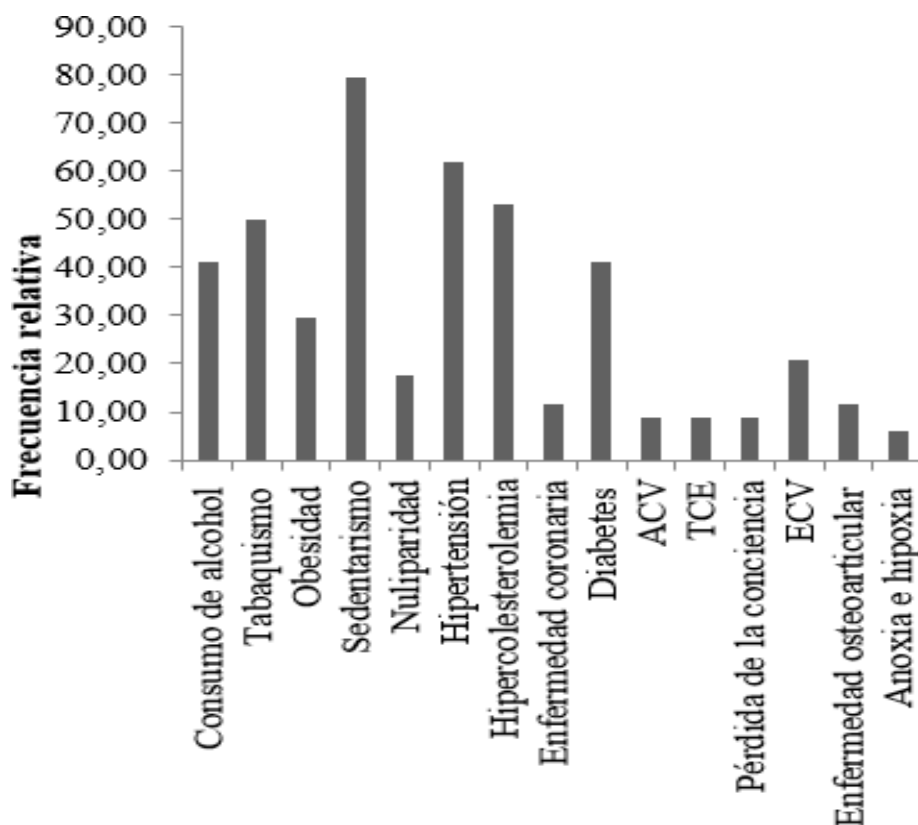


Figura 8. Frecuencias relativas de otras patologías y estilo de vida de los pacientes de la Fundación Alzheimer sede Cali con diagnóstico de EA.

2.5.2 Determinación de genotipos APOE en población afectada con Alzheimer e individuos sin diagnóstico

Es importante la tipificación de las diferentes isoformas del gen APOE, como molécula clave en el Alzheimer esporádico, por ello los análisis de los mismos se presentan a continuación:

La muestra de 71 individuos compuesta por 30 casos y 41 controles, fueron analizadas mediante RFLP's, las frecuencias alélicas y genotípicas encontradas fueron $\epsilon 2$ 0% y 6,1%, $\epsilon 3$ 50% y 93,9%, y $\epsilon 4$ 50% y 0%, para casos y controles respectivamente. Las frecuencias genotípicas encontradas fueron $\epsilon 2\epsilon 3$: 0% y 12,2%, $\epsilon 3\epsilon 3$: 23,33% y 87,8%, $\epsilon 3\epsilon 4$ 0% y 53,33% y $\epsilon 4\epsilon 4$ 0% y 23,33%, casos y controles

respectivamente; los genotipos $\epsilon 2\epsilon 2$ y $\epsilon 2\epsilon 4$ no fueron observados. Los resultados de este trabajo indican que el alelo 4 puede asociarse con susceptibilidad a Alzheimer en la población estudiada.

La tabla 9 presenta las frecuencias genotípicas y alélicas de APOE de los individuos analizados. Las frecuencias genotípicas observadas fueron similares a las esperadas bajo el HWE (casos $p=0,39$; controles $p=0,26$; muestra $p=0,17$). En la población total estudiada el alelo predominante fue APOE $\epsilon 3$ y la variante con menor frecuencia APOE $\epsilon 2$, estando ausentes los genotipos y $\epsilon 2\epsilon 4$. En el grupo de casos, el 50,00% presentó el genotipo $\epsilon 3\epsilon 4$, el 23,33% portaron el alelo $\epsilon 4$ en homocigosis, el 26,67% fueron homocigotos para el alelo $\epsilon 3$, y no se encontraron portadores de APOE $\epsilon 2$ entre los pacientes. En contraste, el 87,80% de los controles presentó el alelo $\epsilon 3$ en homocigosis, el 12,20% presentaron el genotipo $\epsilon 2\epsilon 3$, y no hubo portadores del alelo $\epsilon 4$. Hubo diferencias significativas entre las frecuencias del polimorfismo APOE entre casos y controles ($p<0,05$) (Tabla 9).

La proporción de sexos en el grupo de individuos diagnosticados con la EA estuvo distribuida en 56,25% mujeres y 44,75% hombres, siendo el sexo mayoritario únicamente entre los portadores del genotipo $\epsilon 3\epsilon 4$. La edad promedio de aparición de la patología fue de aproximadamente siete a ocho años más temprano para los portadores de los genotipos $\epsilon 3\epsilon 4$ y $\epsilon 4\epsilon 4$, que para los $\epsilon 3\epsilon 3$ (Tabla 10).

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del gen APOE en una muestra de casos y controles del Valle del Cauca.

APOE	CONTROLES		Total	Valor p
	n=41	CASOS n=30	n=71	
Genotipos, n (%)				1,25E-12
ε2ε2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
ε2ε3	5 (12,20)	0 (0)	5 (7,04)	
ε2ε4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
ε3ε3	36 (87,8)	7 (23,33)	44 (61,97)	
ε3ε4	0 (0)	16 (53,33)	15 (21,13)	
ε4ε4	0 (0)	7 (23,33)	7 (9,86)	
Alelos, n (%)				6,21E-13
ε2	5 (6,1)	0 (0)	5 (3,47)	
ε3	77 (93,9)	30 (50)	110 (76,39)	
ε4	0	30 (50)	30 (20,14)	

Tabla 10. Grupos etarios de la Fundación Alzheimer sede Cali con diagnóstico de EA según elgenotipo APOE

	GENOTIPOS VARIABLE			TOTAL
	E3E3	E3E4	E4E4	
Edad de aparición de la EA				
Mínima	72	41	57	41
Máxima	82	88	79	88
Media	78,57	71,63	70,43	73,54
Sexo				
Hombres (%)	0,00	60,00	33,33	44,75
Mujeres (%)	100,00	40,00	66,67	56,25

El Odds Ratio (OR) de los alelos y genotipos APOE frente a la aparición dela enfermedad de Alzheimer en la muestra analizada, se representa en la tabla 11. Los cuatro genotipos encontrados en los individuos tuvieron ORs estadísticamente significativos. Los genotipos $\epsilon_3\epsilon_4$ (OR=160,60) y $\epsilon_4\epsilon_4$ (OR=73,00) tuvieron Odds Ratios significativamente más altos frente al genotipo de referencia. El alelo que supone mayor riesgo para la aparición de la EA es el ϵ_4 (OR=155,00) mientras que el que otorga menos riesgo es el ϵ_2 (OR= 0,23).

Tabla 11. Odds Ratio (OR) de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico de acuerdo a los genotipos y alelos APOE en individuos del Valle del Cauca

APOE	OR ¹	95% CI	Valor P ²
Genotipos			
ε3ε3 (Referencia)	1,00	0,33- 3,04	-
ε2ε2	-	-	-
ε2ε3	0,44	0,02- 8,88	4,38E-01
ε2ε4	-	-	-
ε3ε4	160,60	8,65- 2981,19	2,23E-09
ε4ε4	73	3,75- 1420,91	3,44E+05
Alelos			
ε3 (Referencia)	1,00	0,55- 1,81	-
ε2	0,23	0,01- 3,18	1,29E-01
ε4	155,00	6,61- 1868,44	1,15E-11

¹El cálculo se realizó utilizando APOE ε3/ε3ε3 como referencia.

²El valor P reportado es resultado de la prueba exacta mid-p.

Finalmente, y necesario, las frecuencias obtenidas fueron comparadas con reportes en Colombia, como fue mencionado al inicio de este capítulo, la población de estudio al ser tipificada por primera

vez en pacientes, es de relevancia poder estimar lo hallado en el Valle del Cauca con estudios de casos para otras regiones.

La tabla 12 presenta las frecuencias genotípicas y alélicas de APOE de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer provenientes del presente estudio y de dos ciudades de Colombia reportadas recientemente. El alelo mayoritario entre los pacientes de las tres regiones es APOE $\epsilon 3$ con frecuencias de hasta 55,00%, seguido de APOE $\epsilon 4$ con un rango de frecuencias entre 40,00% y 50,00%. El genotipo más frecuente entre pacientes de las tres regiones es $\epsilon 3\epsilon 4$, el cual oscila entre 42,00% y 65,62%. Dentro del grupo de pacientes analizados en la ciudad de Barranquilla hubo ausencia del genotipo homocigoto para el alelo $\epsilon 4$, a diferencia de los pacientes del presente estudio y de Bogotá. Asimismo, el alelo con la frecuencia minoritaria en general fue el $\epsilon 2$ se encontró en mayor proporción en los pacientes de la ciudad de Barranquilla. Es importante observar que las tendencias de las frecuencias entre ciudades son similares, y que existe dependencia entre la región geográfica de la cual provienen los pacientes y las frecuencias APOE (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de los genotipos y alelos APOE en pacientes con Alzheimer de tres ciudades en Colombia

APOE	CALI ¹	BOGOTÁ ²	BARRANQUILLA ³	Valor p
	n=30	n=50	n= 32	
Genotipos, n				
(%)				0,0017
$\epsilon 2\epsilon 2$	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,13)	
$\epsilon 2\epsilon 3$	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (3,13)	

ε2ε4	0 (0,00)	3 (6,00)	5 (15,62)	
ε3ε3	7 (23,33)	17 (34,00)	4 (12,50)	
ε3ε4	16 (53,33)	21 (42,00)	21 (65,62)	
ε4ε4	7 (23,33)	9 (18,00)	0 (0,0)	
Alelos, n (%)				0,02315
ε2	0 (0,00)	3 (3,00)	8 (12,50)	
ε3	30 (50,00)	55 (55,00)	30 (46,88)	
ε4	30 (50,00)	42 (42,00)	26 (40,62)	

¹Datos del grupo caso del presente estudio.

²Salcedo Tacumá, D. R. (2018) Análisis de metilación en una isla CpG del gen APOE y en una región genómica del gen BIN1 en una muestra de pacientes colombianos con Enfermedad de Alzheimer Esporádico. Universidad Nacional de Colombia.

³Meza-Cely, N. et al. (2020) ‘Caracterización de pacientes con demencia de tipo Alzheimer precoz vs tardío’, Acta Médica Colombiana, 45(2), pp. 1–8. doi: <https://doi.org/10.36104/amc.2020.1316>.

2.5.3 Selección de genotipos APOE por paciente afectado con Alzheimer e individuos sin demencia para análisis de Exoma

A partir de los genotipos obtenidos, fueron seleccionados los pacientes con al menos una copia del alelo E4 para secuenciación de exoma y dos pacientes sin el alelo E4 (Tabla 13).

Tabla 13. Selección de genotipos de pacientes con la enfermedad de Alzheimer e individuos controles sin la patología, para análisis de exoma

Pacientes con Alzheimer	Genotipo ApoE
ADEX01	E3E3
ADEX03	E4E4
ADEX04	E3E4
ADEX05	E3E4
ADEX06	E3E4
ADEX07	E4E4
ADEX09	E3E3
ADEX10	E3E4

Individuos sin Alzheimer	Genotipo ApoE
ADEX11	E2E3
ADEX12	E3E3
ADEX13	E3E4
ADEX14	E4E4

Con la población de estudio seleccionada se realizó un análisis del exoma de cada individuo. Los genotipos dentro de los grupos fueron determinantes para proceder con el análisis genómico. Esto dado a que el gen APOE en su estado homocigoto y heterocigoto proporciona alteración metabólica en moléculas que, con carga genética alterada, conlleva a la susceptibilidad y al desarrollo de la patología estudiada, partiendo de individuos afectados por patologías previas.

Es observable que, a pesar de tener individuos sin la Enfermedad de Alzheimer, el metabolismo celular de estos individuos se rige por copias del alelo E4 (alelo alterado), lo cual direcciona aún más la necesidad de conocer tipos de interacción tanto génica como ambiental.

Fueron obtenidos 70 mil variantes deletéreas para 30 mil genes por exoma, para ello fueron aplicados filtros a partir de predictores de patogenicidad siendo el más determinante la base de datos del Clinvar,

Enrich y String Genome , permitiendo el registro inicial de toda la información obtenida por paciente, en caso de que se hallarán cambios patogénicos, a su vez se valoró el impacto de la variación siendo catalogada como alta, baja o poco significativa, todo en relación al fenotipo del paciente. La información de cada variante, el impacto que genera y ubicación en el genoma permitieron hallar niveles de penetrancia alta de estas variantes en el paciente, todas en dirección al MAF (Minor allele frequency) y a los análisis de alineamiento.

Para definir las variantes importantes o significativas teniendo en cuenta de que no se usaron muchos parámetros por defecto en los algoritmos sino lo que proporcionara contundencia en cambios significativos o variantes significativas en el genoma, fue empleado FreeBayes, un algoritmo que permite resolver lo enunciado. Dado a que se tiene una enfermedad altamente heterogénea y compleja en términos genéticos o de susceptibilidad se requieren métodos mucho más precisos que los genéricos o estándar para poder dar certeza en la identificación e imputación de las variantes.

Para esto, los genes encontrados por exoma fueron clasificados según su grado de impacto por genoma de paciente (Tabla 14).

Tabla 14. Clasificación por impacto biológico de número de genes encontrados en los exomas analizados

GRADO DE PATOGENICIDAD A DESARROLLO DE ALZHEIMER			
# GENES ENCONTRADOS	Impacto bajo	Impacto medianamente modificador	Impacto Alto
	82	428	26

Al mencionar “impacto” se hace referencia a los cambios encontrados. Luego de hacer la predicción de las variantes es importante reconocer cuales fueron significativas, para ello el uso de la plataforma

ClinVar como herramienta, permitió una clasificación muy importante ya que estratifica los tipos de variantes independiente del tipo de la misma, es decir, las variantes que a través de la herramienta parecen con “mayor patogenicidad” no necesariamente son variantes que están generando un impacto fuerte sobre la proteína o que si la variante tiene una menor o mayor frecuencia en la población.. Ambas situaciones ClinVar permite obtener, todo en términos de la patogenicidad y frecuencia presente de la misma en la población.

Tabla 15. Genes seleccionados con mayor prevalencia en relación patológica y fenotipo de la población de estudio

GENE	ADEX 01	ADEX 03	ADEX 04	ADEX 05	ADEX 06	ADEX 07	ADEX 09	ADEX 10	ADEX 11	ADEX 12	ADEX 13	ADEX 14	IMPACTO*
VDR	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	Alto
ERCC1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	Alto
VKOR C1	0	1	1	1	1	1	2	1	0	1	1	0	Alto
TOR1A IP1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	Alto
KDR	0	0	1	2	1	1	2	1	2	0	0	0	Alto
COMT	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	Alto
ITPA	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	Alto
ISG15	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	Alto
EPHX2	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Alto
LIG1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Alto

*Impacto y/o efecto de la variante sobre la proteína

Encontrar un gen con alta tendencia a desarrollar Alzheimer, es complejo, por ello se hace análisis funcional que agrupe genes en categorías por acción funcional.

El análisis global de todos los exomas, arrojó 537 genes (Anexo 1) con variación patogénica y 150 genes aproximadamente (Anexo 2) por muestra estudiada. Reconociendo las variantes patogénicas a través de métodos de enriquecimiento, fueron clasificadas aquellas con mayor asociación al fenotipo de la población de estudio. El empleo de filtros adicionales fue necesario, mostrando en la Tabla 15

los genes con importancia biológica e implicación en los perfiles patogénicas de cada individuo y con los cuales soporta científicamente esta investigación. Los genes en la tabla 9, fueron depurados con el objetivo de establecer aquellos con mayores variables alteradas por paciente y en al menos 3 casos con Alzheimer, estos rangos son definidos dado el tipo de análisis empleado, es decir, al ser bajo el número de exomas fue utilizado GATK y algoritmos bayesianos soportando cada variante en 1000 genomas.

Tabla 16. Indicadores génicos patológicos a partir de los exomas de pacientes con Alzheimer

GENE	DESCRIPCIÓN PATOLÓGICA	IMPLICACIÓN EN METABOLISMO LIPÍDICO	INDICADOR DE ALZHEIMER
PCSK9	Familia de las Hipercolesterolemias	Si	Si
F5	Factor V de Trombofilia	N/A	No
TTN	Miocardopatía dilatada; Miopatía distal - distrofia muscular tibial; Visión general de la miocardopatía hipertrófica; Miopatía de Salih; Miopatía hereditaria con insuficiencia respiratoria temprana	N/A	No
COL4A4	Síndrome de Alport	N/A	No
KDR	Descripción general de la hipertensión arterial pulmonar hereditaria	N/A	No
CYP21A2	Hiperplasia suprarrenal congénita deficiente en 21-hidroxilasa	Si	Este polimorfismo no se encuentra en lista para Alzheimer
COL11A2	disfunción del cerebro y del sistema nervioso central como un importante objetivo nutricional y de estilo de vida para un envejecimiento saludable	N/A	Disfunción cerebral y de sistema nervioso
POR	Deficiencia de citocromo P450 oxidoreductasa	N/A	No
KCNH2	Síndrome de QT largo; Síndrome de Brugada, afección en sistema nervioso, actúa en canales de potasio	N/A	no reportado
PRF1	Diabetes	N/A	no reportado
KCNJ11	Hiperinsulinismo familiar; Diabetes Mellitus Neonatal Permanente; Diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes Visión general	N/A	no reportado
F2	Protrombina Trombofilia	N/A	No

ERCC5	Pérdida de mielina	N/A	Si
TP53	Predisposición al Tumor de Wilms; Síndrome de Li-Fraumeni	N/A	no reportado
PRCD	Descripción general de la retinitis pigmentosa no sindrómica	N/A	No
APOE	Descripción general de la Enfermedad de Alzheimer	Si	Si
ERCC1	Pérdida de mielina	N/A	Si
COL6A2	Distrofias relacionadas con el colágeno VI	N/A	NO

Los biomarcadores descritos en la tabla 10 hacen parte del pool de genes encontrados en los diferentes fenotipos caracterizados en cada muestra, es importante resaltar que las descripciones patológicas solo proporcionan información relevante a nivel clínico hallada en cada paciente, comprendiendo que solo dos genes (PCSK9 y APOE) se encuentran vinculados directamente en vías metabólicas y el desarrollo a la enfermedad de Alzheimer, hipótesis de este trabajo. Sin embargo, genes como el CYP21A2, ERCC1, ERCC5, se discuten como implicados del proceso y progreso de formación patológica, demostrando nuevamente que la Enfermedad de Alzheimer no es una patología con asociación directa. Es allí donde se enlistan todos los genes con mayor impacto en la población estudiada, obteniendo efecto bajo o medio a nivel biológico ya que todos estos pueden estar encargados de efectos tan complejos e intensos a nivel neuronal. Esto puede observarse en la figura 9, donde las redes de interacción biológica muestran conexión en distintos procesos celulares.

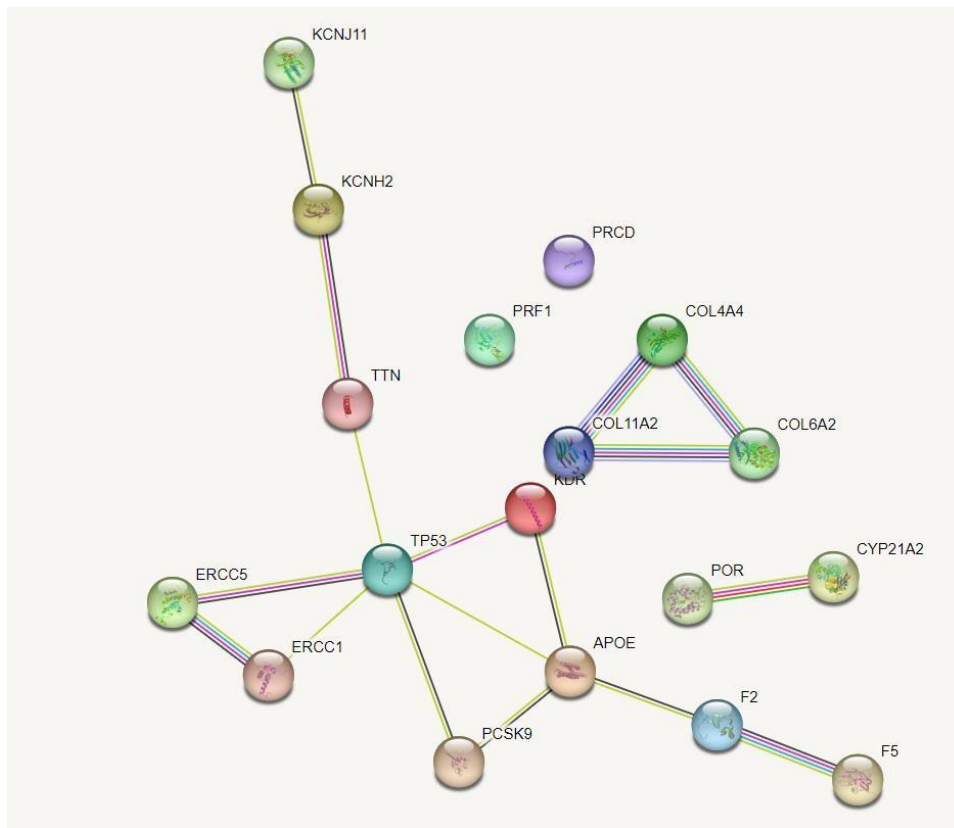


Figura 9. Red de interacción de genes candidatos

De acuerdo a las redes de asociación funcionales de proteínas (STRING), se encontraron interacciones entre sí, en 16 genes. Esto significa que las proteínas que codifican estos genes, tienen más interacciones entre ellas de lo que se esperaría de un conjunto aleatorio de proteínas de tamaño similar, extraídas del genoma. Tal enriquecimiento indica que las proteínas están al menos parcialmente conectadas biológicamente, como un grupo.

Las 2 proteínas restantes, como se observa en la figure 9, no presentaron interacción con ninguno de los genes candidatos. Esto significa que no están muy bien conectadas. Sin embargo, esto podría ser debido, a que estas proteínas no se han estudiado a fondo y STRING aún no identifica sus interacciones.

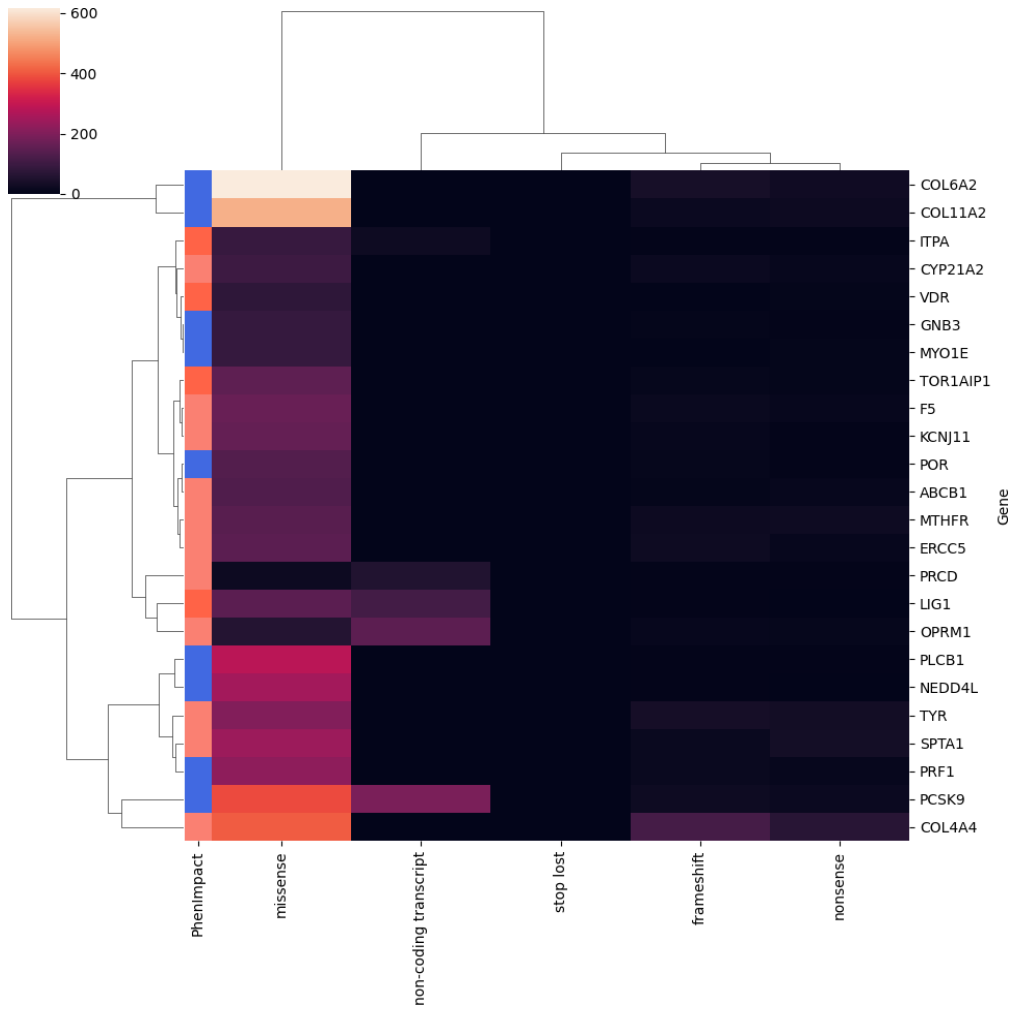
2.5.4 Gráficos con variantes determinadas con mayor, medio y bajo impacto deletéreo en los diferentes genes encontrados por exoma estudiado

El conjunto de genes por exoma fue separado según el número o cantidad de variantes con alto, bajo y mediano efecto patogénico. Es importante esclarecer que, aunque fueron separadas dado a que son muchas las variantes “impacto alto” (cerca de 11.371 variantes missense con impacto alto, bajo y moderado, solo para tres genes TTN, KCNH2 y TP53) encontradas, todas conducen a alterar la proteína que codifican.

Comparaciones entre los genes patogénicos, donde fueron clasificados los genes en términos de una característica molecular o fenotípica y dependiendo del tipo de mutación que contienen, por ejemplo las “missense” o en sentido errado son las mutaciones más representativas en todos los genes pero se quiere saber cuáles son los genes que más tienen estas variantes o las que son de significado incierto, es por ello que el ideograma agrupa los genes a partir de un análisis funcional y de esta manera saber si hay correlación biológica importante entre ellos.

A través de un análisis de correlación completa, se tomaron los genes por grupos patogénicos y altamente patogénicos empleando la herramienta Heatmap, permitiendo un alineamiento simple entre los genes con mayor y menor variantes interconectadas funcionalmente, siendo representados en el ideograma de las figuras 10, 11 y 12.

A.



B.

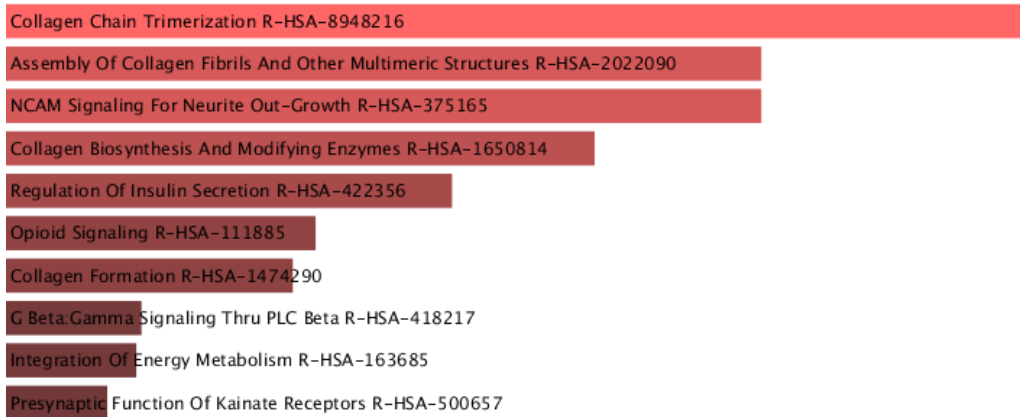
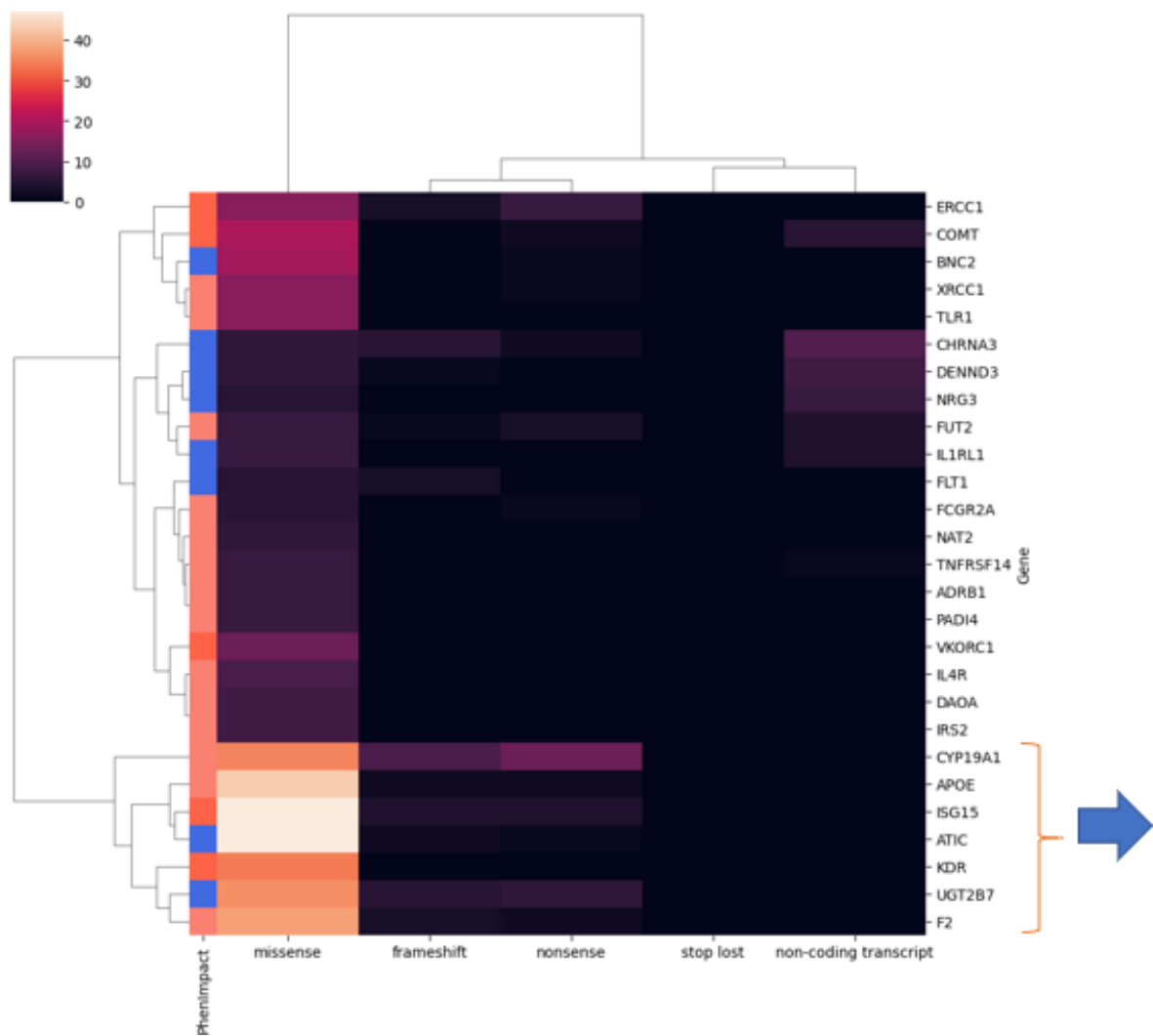


Figura 10. A. Mapa de calor y agrupamiento de genes con número alto de variantes génicas en el exoma de la población de estudio. **B.** Correlación de las principales vías biológicas en las que actúan los diferentes genes. El color rojo demuestra agrupamiento de genes con mayor impacto genotípico.

Dentro de las vías biológicas en que actúan los diferentes genes, se tienen niveles de expresión aleatorios, es decir, múltiples vías no lipídicas ni dirigidas a sistema nervioso central que soporten el efecto directo al desarrollo de Alzheimer. Siendo todos los genes en relación, los que presentan mayor cantidad de variantes en sentido errado, pero baja relación con el fenotipo neuronal patológico.

A.



B.



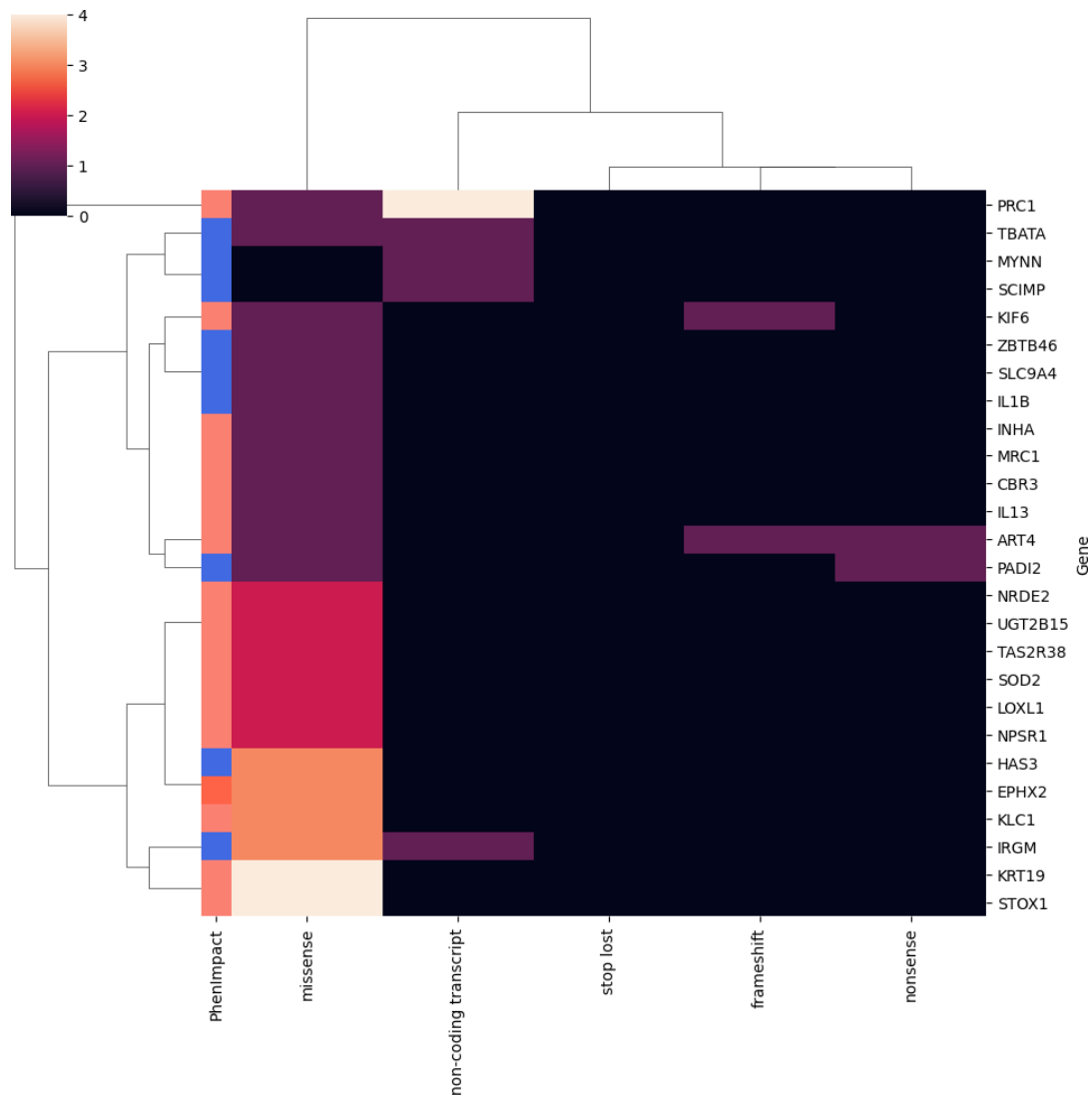
Figura 11. A. Mapa de calor y agrupamiento de genes con número medio de variantes modificables halladas en el exoma de la población de estudio. Los genes agrupados en el corchete y señalados con la flecha azul, indican aquellos que actúan en metabolismo de grasas y producción de hormonas B. Enriquecimiento y correlación por grupos de genes que actúan en principales vías biológicas en que actúan los diferentes genes.

El mapa de calor de la figura 11, representa los genes estratificados por variantes modificables, es importante resaltar el agrupamiento de los genes CYP19A1, APOE, ISG15, ATIC, KDR, UGT2B7

y F2 (agrupados en la parte inferior de la figura 11A), quienes actúan en vías de metabolismo y degradación de lípidos, señalización y producción de metabolitos secundarios, procesos oxidativos y desestabilidad de las mielinas.

A nivel celular, estas diferentes reacciones moleculares, sistemáticas y en red, conllevan a un efecto de sinergismo metabólico basado en rutas enriquecidas y de expresión genética, donde el impacto fenotípico de los genes en conjunto puede explicar la etiología de la enfermedad.

A.



B.

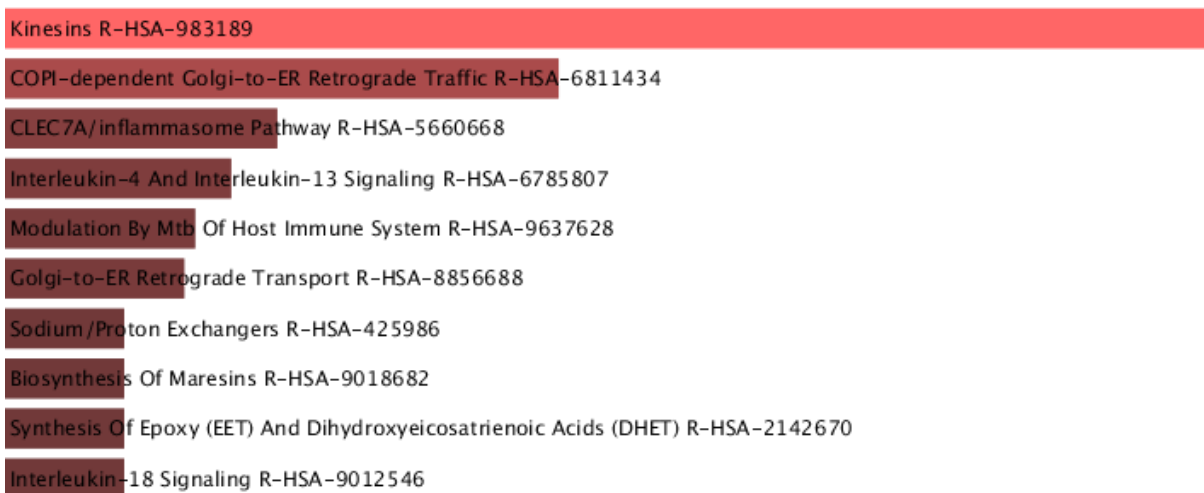


Figura 12. A. Mapa de calor y agrupamiento de genes con número bajo de variantes modificables halladas en el exoma de la población de estudio. **B.** Enriquecimiento y correlación por grupos de genes que actúan en principales vías biológicas en que actúan los diferentes genes.

Los genes seleccionados con bajo número de variantes modificables, pueden incursionar en un efecto genotipo – fenotipo de gran importancia, es decir, todas las variantes se encuentran intrínsecas a procesos vitales, en el caso de una enfermedad crónica como el Alzheimer, donde hay una susceptibilidad y no una asociación directa, los genes con variantes moderadas y variantes con menor número, pueden ser las encargadas de esos efectos complejos, intensificando por medio de suma de efectos biológicos o interacción genotipo ambiente.

El exoma de cada paciente se caracteriza por fenotipos persistentes, todos previos al desarrollo del péptido beta. Es aquí donde la búsqueda de nuevas etiologías no basadas en lo que conlleva al desarrollo de Alzheimer por formación de ovillos fibrilares, beta amiloide, estrés oxidativo, etc, pueden definir el rumbo correcto de comprensión a nivel genético.

CLASIFICACIÓN DE RASGOS FENOTÍPICOS DESCRITOS PARA LOS GENES SELECCIONADOS

PATOGENICIDAD VS ASOCIACIONES FENOTÍPICAS

A.

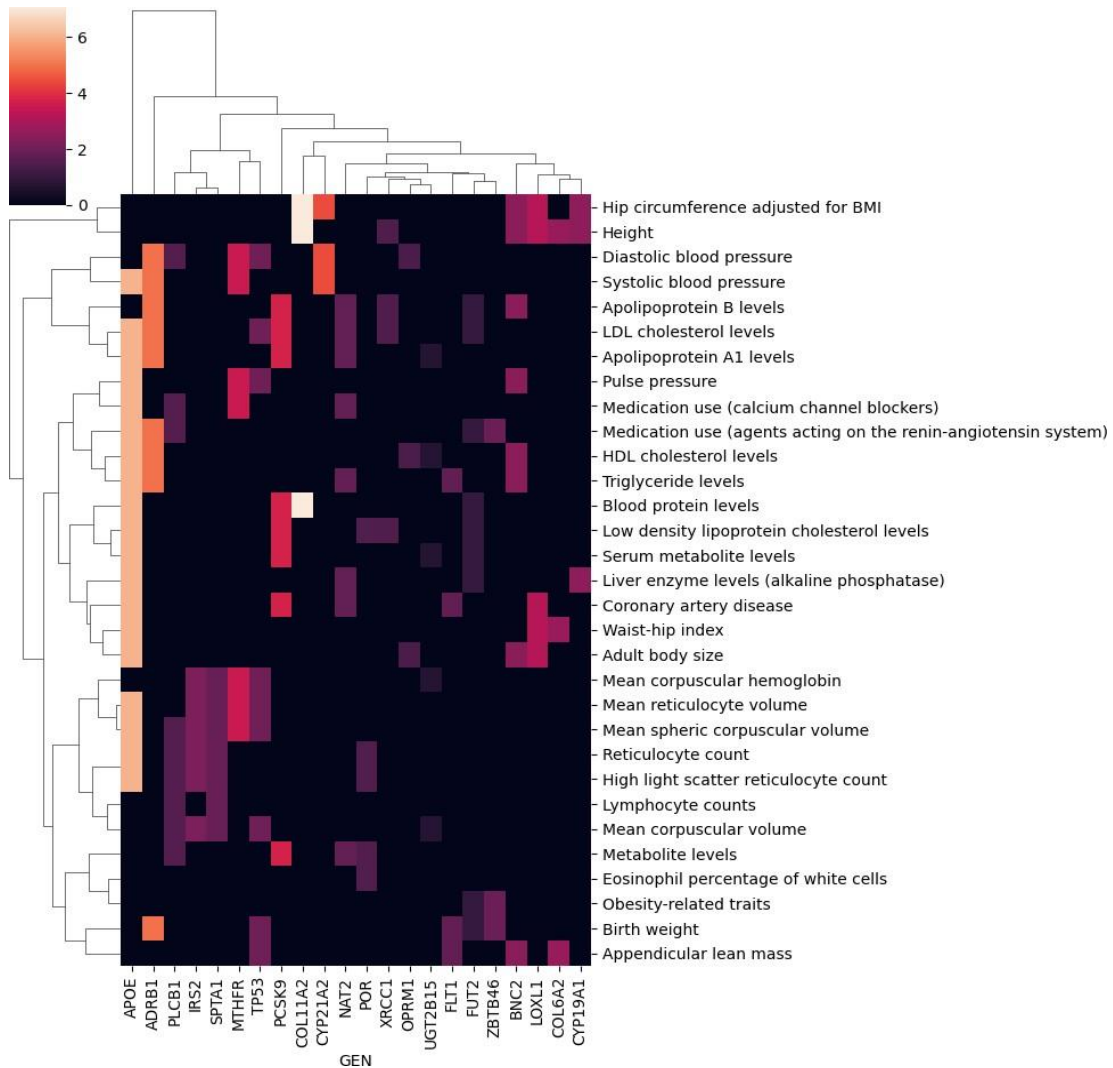
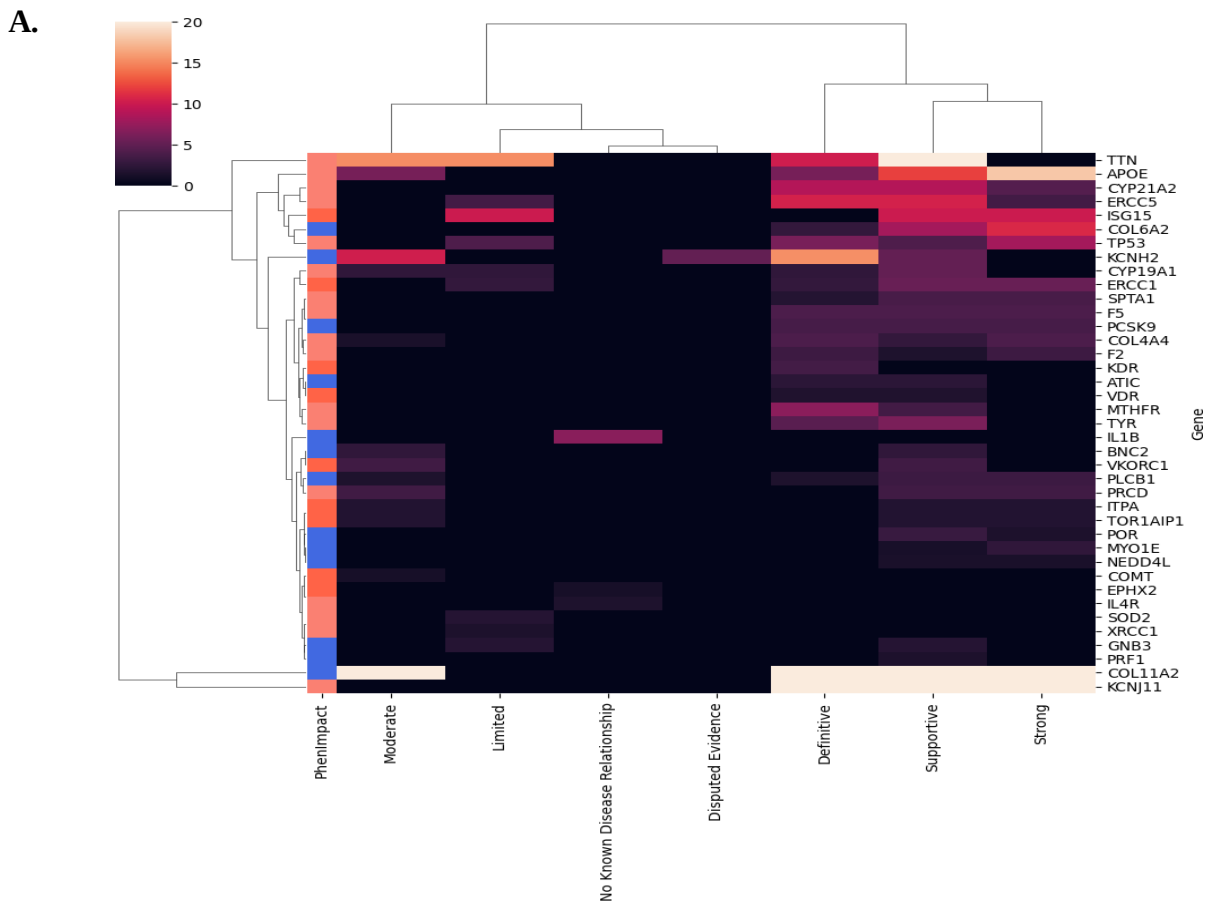


Figura 13. A. Genes con rasgo patológico asociado a metabolismo lipídico. El impacto fenotípico de estos genes, aunque no es severo dado a que sus frecuencias no son muy altas, tienen influencia en las características fisiopatológicas de la Enfermedad de Alzheimer.

Los diferentes rasgos fenotípicos para cada uno de los genes, presentaron un enfoque funcional mucho más evidente asociados con características fenotípicas encontradas en la población de estudio (figura 8 y 9) mostrando hallazgos en variantes patogénicas asociadas a un metabolismo lipídico, es decir hay asociación, aunque las frecuencias no son altas o no hay un impacto fenotípico muy severo, en enfermedades complejas como el Alzheimer, al ser una patología crónica y con aparición a edades muy adultas, se explica cómo los factores de riesgo pueden estar potenciando la aparición o manifestación de la variante, los cual los fortalece como buenos biomarcadores.

PATOGENICIDAD VS IMPACTO FENOTÍPICO



B.

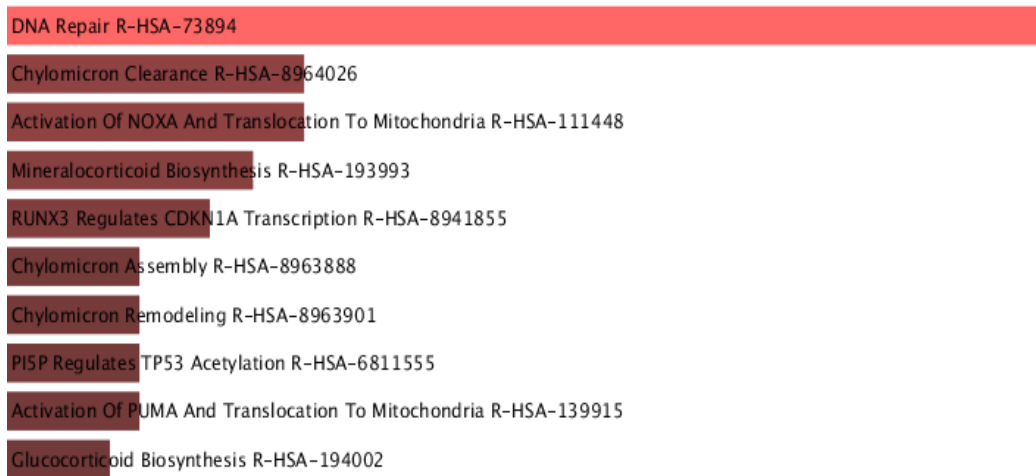


Figura 14. A. Genes con rasgo patológico asociado a metabolismo lipídico. **B** Correlación de principales rutas biológicas en que actúan los diferentes genes.

La figura 14 muestra una vez más cómo el Alzheimer es una patología sumamente compleja, al ser crónica, el efecto patología y fenotipo hace que al encontrar múltiples genes, muchos publicados en bases de datos como el Alzgene y otros sin documentación o estudios mínimos, constata una vez más, el deterioro neurológico consecuente con la edad es irreversible, sumando a ello, que el ambiente en que las poblaciones crecen y se reproducen, es crítico, activando moléculas que por estrés metabólico o exceso del mismo, deterioren el cerebro.

Al depurar y enriquecer tanto vías como genes, se obtuvo procesos fenotípicos con la vinculación de genes “mayores” como el APOE, principal transportador lipoproteico, COL6A2, CYP19A1, PCSK9, que actúan tanto en regulares niveles metabólicos, asociación a enfermedades coronarias y regulación lipoproteica.

2.6 DISCUSIÓN

El Alzheimer como enfermedad neurodegenerativa la cual desencadena la actividad estructural y funcional de los sistemas nerviosos central y periférico (SNC y SNP) sigue siendo un desafío desde el punto de vista genético y molecular. Los genes estudiados en este capítulo a partir de lo generado tanto por la tipificación del gen APOE como primer estudio en población afectada del Valle del Cauca - Colombia, cómo los análisis moleculares arrojados por los diferentes exomas, proporciona claridad de la fuerte interacción del gen APOE con su isoforma E4 y múltiples eventos celulares diferentes a la tradicional hipótesis del péptido Beta, principal mecanismo biológico estudiado por décadas para la comprensión de la patología.

La aparición de la EA está sujeta a múltiples factores de riesgo que pueden o no ser modificados por los individuos, estando entre los no modificables diversos síndromes metabólicos. Es allí donde los diferentes fenotipos hallados en los pacientes llaman la atención referente a diversidad de factores anómalos que van apareciendo con la edad, ejemplo de ello la hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes, patologías más frecuentes. En términos generales estas enfermedades se asocian con el incremento de riesgo y velocidad de desarrollo de Alzheimer, ya que promueven la inflamación y atrofia cerebral causadas por la acumulación de βA y proteína tau (Eid, Mhatre y Richardson, 2019). Asimismo, el TCE, las ECVs y los ACVs, que fueron observados en menos proporción entre los pacientes, contribuyen a los efectos que tiene la EA sobre el cerebro como el incremento en la agregación proteica, incremento del riesgo y velocidad de aparición de demencia (Vijayan y Reddy, 2016; Eid, Mhatre y Richardson, 2019). No obstante, el desarrollo del Alzheimer también está asociado a factores de riesgo que pueden ser transformados para disminuir la probabilidad de aparición de esta patología, como lo es el estilo de vida. Los pacientes analizados en este capítulo

reportaron hábitos como el sedentarismo, tabaquismo, consumo de alcohol y obesidad, los cuales promueven la aparición de las patologías más prevalentes descritas dentro del mismo grupo y que, como se mencionó anteriormente, acrecientan el riesgo frente a la EA (Eid *et al.*, 2019).

2.6.1 Alelos APOE sus frecuencias y distribución en afectados y no afectados con Alzheimer

La influencia de la ancestría genética sobre los genotipos de APOE se marcan en como a partir de los grupos de casos y controles por separado, el alelo más común fue el $\epsilon 3$, coincidiendo con estudios realizados previamente en el Valle del Cauca y otras poblaciones del suroccidente colombiano (Rivera *et al.*, 2015; Perdomo *et al.*, 2020).

Al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de APOE se observaron diferencias significativas entre casos y controles. Los casos presentan mayor prevalencia de APOE $\epsilon 4$ que los controles, indicando una posible asociación de este alelo con la presencia de la EA en esta región del país. Esto coincide con estudios recientes, en los cuales la proporción de frecuencias de los genotipos $\epsilon 3\epsilon 4$ y $\epsilon 4\epsilon 4$ en conjunto superaron a la de $\epsilon 3\epsilon 3$ entre pacientes con Alzheimer; asimismo se observa un patrón con otras regiones de América donde el genotipo predominante entre pacientes con EA es $\epsilon 3\epsilon 4$, seguido del homocigoto para $\epsilon 4$ (Salcedo Tacumá, 2018; González *et al.*, 2020; Reiman *et al.*, 2020; Marca-Ysabel *et al.*, 2021).

El alelo con la frecuencia minoritaria en toda la muestra fue $\epsilon 2$. Esta variante no se encontró entre el grupo de casos y entre controles sólo estuvo presente en el genotipo $\epsilon 2\epsilon 3$, coincidiendo con estudios realizados previamente (Arango Viana *et al.*, 2014; Rivera *et al.*, 2015; Moreno *et al.*, 2017; Perdomo *et al.*, 2020). Lo anterior se puede atribuir a aspectos que han sido discutidos previamente en la literatura, el principal siendo que APOE $\epsilon 2$ es el alelo menos común y cuya prevalencia mundial es menor al 10% (Husain *et al.*, 2021). La población de Colombia se ha descrito como resultado del

mestizaje entre africanos, europeos y nativos americanos, con un componente amerindio en el sur occidente colombiano entre el 50 y 82% (Rojas *et al.*, 2010; Franco-Candela y Barreto, 2017). APOE $\epsilon 2$ está casi ausente en poblaciones indígenas americanas y con alto componente Amerindio, llevando a inferir que la proporción nativa de los individuos analizados pudo contribuir a su baja frecuencia observada (Gerdes, 2002; Martínez-Magaña *et al.*, 2019; Husain *et al.*, 2021; Marca-Ysabel *et al.*, 2021). Finalmente, la ausencia de $\epsilon 2$ entre los casos es resultado de las propiedades que se le ha atribuido a este alelo frente a la EA. APOE $\epsilon 2$ está sub representado entre personas afectadas con EA y se ha descrito que sus portadores tienen un riesgo considerablemente bajo a padecer la patología en comparación con portadores de APOE $\epsilon 3$ (González *et al.*, 2020; Reiman *et al.*, 2020; Husain *et al.*, 2021).

El OR ilustra la probabilidad de aparición de una enfermedad en particular y puede oscilar entre 0 y el infinito, el valor 1 indicando que el riesgo frente a la enfermedad es igualmente probable entre afectados e individuos sanos (Chen *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2011). En este trabajo se encontró que portar APOE $\epsilon 4$ aumenta el riesgo (OR=155,00) de desarrollar EA cuando comparados con portadores de APOE $\epsilon 3$ en el Valle del Cauca, asemejándose a resultados de otras poblaciones (González *et al.*, 2020; Reiman *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). La literatura ha descrito los OR genotípicos de APOE en distintas poblaciones del mundo, la mayoría obteniendo un OR mayor para el homocigoto $\epsilon 4$ que para los heterocigotos (Farrer *et al.*, 1997; Reiman *et al.*, 2020; Husain *et al.*, 2021). Sin embargo, en este trabajo se obtuvo que el genotipo $\epsilon 3\epsilon 4$ confería un riesgo significativamente mayor (OR=160,60) para EA que $\epsilon 4\epsilon 4$ (OR= 21,47). Estos resultados son concordantes con los reportados en 1997 por Farrer y colaboradores en hispanos, y asimismo en otro estudio más reciente realizado en España y Portugal (González *et al.*, 2020; Reiman *et al.*, 2020). Esto puede ser explicado por las tendencias observadas en estudios realizados en Latinoamérica: (1)

La frecuencia de casos APOE $\epsilon 4$ es baja al compararla con grupos caso de otras etnias, lo que a su vez causa una mayor proporción de individuos caso $\epsilon 3\epsilon 4$ que homocigotos $\epsilon 4$ y (2) más casos que controles con el genotipo $\epsilon 3\epsilon 4$ (Farrer *et al.*, 1997; Salcedo Tacumá, 2018; González *et al.*, 2020; Marca-Ysabel *et al.*, 2021). Esta tendencia se debe validar para este estudio utilizando una muestra mayor de pacientes.

El Alzheimer es resultado de un conjunto de diversos factores que incrementan la probabilidad de desarrollo de la patología, uno de ellos siendo el sexo. Este capítulo además observó que más de la mitad del grupo de casos estaba conformado por mujeres (56,25%). Lo anterior coincide con la literatura, donde se ha notado que la enfermedad es más prevalente en mujeres que los hombres. Asimismo, se ha asociado al sexo femenino con un riesgo aumentado de desarrollar la enfermedad, lo cual sucede por diferencias hormonales, de los mecanismos de inflamación y de dinámicas mitocondriales entre sexos. El estrógeno es una hormona que está involucrada en el mantenimiento de neuronas colinérgicas. Sin embargo, en mujeres de edad avanzada hay una disminución de estrógeno, lo cual contribuye a la degeneración neuronal progresiva causada por la EA. Lo anterior, sumado a la presencia de APOE $\epsilon 4$, lleva a que las mujeres sufran mayor atrofia cerebral en menor tiempo y por ende una progresión más acelerada del Alzheimer que los hombres (Alzheimer's Association, 2019; Eid *et al.*, 2019).

2.6.2 Sinergismo de APOE con genes obtenidos a partir de Exomas

Aunque los estudios iniciales vincularon la apolipoproteína E con la agregación y eliminación del péptido amiloide- β , en los últimos 5 años las tecnologías de secuenciación de próxima generación han promovido en gran medida los avances en el estudio de las enfermedades humanas a nivel genómico, transcriptómico y epigenético (Bao *et al.*, 2014). Los avances en las tecnologías de

secuenciación de próxima generación (NGS) han resultado en una proliferación sin precedentes de datos ómicos, específicamente, los estudios ómicos de patologías neurodegenerativas, han contribuido a la comprensión de los mecanismos genéticos que promueven el surgimiento y el desarrollo de esta enfermedad (Chandler et al., 2016).

Es importante tener en cuenta que el exoma de cualquier individuo contiene un gran número de variaciones genéticas que alteran la secuencia de proteínas, pero solo una pequeña fracción de estas alteraciones puede afectar la función de la proteína (Miosge et al., 2015) y tener relación con la patología aquí estudiada. Es por esta razón, que en el presente capítulo se diseñaron procedimientos de priorización, los cuales requirieron la combinación de diferentes recursos, incluyendo razonamiento biológico, molecular y biomédico uso de medidas estadísticas, búsqueda en bases de datos y literatura.

La clasificación de los genes por impacto biológico fue tomada según este fuera alto, medio y bajo sobre los cambios en la proteína, de esta manera de los 536 genes obtenidos a partir de los exomas analizados, se seleccionaron según su expresión diferencial y repercusión en el fenotipo del paciente, recordando que la muestra de pacientes estudiada contaba con una carga génica altamente crónica.

Los datos de recuento se llevaron a cabo a partir de los genes descritos en la (Tabla 15). Este top de genes hace parte de un sin número de procesos moleculares positivos a enfermedades crónicas diferentes al Alzheimer, pero que, por originarse en etapas diferentes de la edad, suman en efecto el deterioro del cerebro.

A continuación, se describen los productos de estos genes:

EPHX2, es un gen que codifica un miembro de la familia del epóxido hidrolasas. La proteína que se encuentra tanto en el citosol como en los peroxisomas, se une a epóxidos específicos y los convierte

en los dihidrodioles correspondientes. Las mutaciones en este gen se han asociado con hipercolesterolemia familiar, lo cual es clave en el ruido metabólico que se genera en el Alzheimer.

ISG15, La proteína codificada por este gen es una proteína similar a la ubiquitina que se conjuga con proteínas diana intracelulares tras la activación por interferón-alfa e interferón-beta. Se han atribuido varias funciones a la proteína codificada, incluida la actividad quimiotáctica hacia los neutrófilos, la dirección de las proteínas diana ligadas a los filamentos intermedios, la señalización de célula a célula y la actividad antiviral durante las infecciones virales. Si bien se ha encontrado que los conjugados de esta proteína están unidos de forma no covalente a los filamentos intermedios, esta proteína a veces se secreta en el cerebro.

ERCC1, el producto de este gen funciona en la ruta de reparación por escisión de nucleótidos y es necesario para la reparación de lesiones en el ADN. La proteína codificada forma un heterodímero con la endonucleasa XPF (también conocida como ERCC4) y la endonucleasa heterodimérica cataliza la incisión 5' en el proceso de escisión de la lesión de ADN. La endonucleasa heterodimérica también está involucrada en la reparación del ADN recombinante y en la reparación de enlaces cruzados entre hebras. Las mutaciones en este gen dan como resultado el síndrome cerebrooculofacioesquelético, y los polimorfismos que alteran la expresión de este gen pueden desempeñar un papel en la carcinogénesis. Se han encontrado múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen.

LIG1, codifica un miembro de la familia de proteínas ligasas de ADN dependientes de ATP. La proteína codificada funciona en la replicación del ADN, la recombinación y el proceso de reparación por escisión de bases. Las mutaciones en este gen que conducen a la deficiencia de ADN ligasa I dan

como resultado inmunodeficiencia y una mayor sensibilidad a los agentes que dañan el ADN. La interrupción de este gen también puede estar asociada con una variedad de cánceres.

KDR, es un importante factor de crecimiento para las células endoteliales. Este gen codifica uno de los dos receptores del VEGF. Este receptor, conocido como receptor de dominio de inserción de quinasa, es un receptor de tirosina quinasa de tipo III. Funciona como el principal mediador de la proliferación, supervivencia, migración, morfogénesis tubular y germinación endotelial inducida para neuronas tipo glías.

VDR, Este gen codifica el receptor de vitamina D3, que es un miembro de la superfamilia de receptores hormonales y del metabolismo de vitaminas cruciales como la D, uno de los principales cofactores en la sinapsis neuronal.

COMT, este gen codifica para las catecol-O-metiltransferasa cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosilmetionina a las catecolaminas, incluidos los neurotransmisores dopamina, epinefrina y norepinefrina, juega un papel fundamental en el metabolismo de sustancias endógenas, siendo crucial en el metabolismo de fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión.

ITPA, codifica una inosina trifosfato pirofosfohidrolasa. La proteína codificada hidroliza el trifosfato de inosina y el trifosfato de desoxinosina a nucleótido monofosfato y difosfato. Esta proteína, que es miembro de la familia de proteínas HAM1 NTPase, se encuentra en el citoplasma y actúa como un homodímero. Los defectos en la proteína codificada pueden provocar una deficiencia de inosina trifosfato pirofosforilasa que provoca una acumulación de ITP en los glóbulos rojos.

TOR1AIP1, codifica una proteína de membrana integral de tipo 2 que se une a las láminas de tipo A y B. La proteína codificada se localiza en la membrana nuclear interna y puede participar en el mantenimiento de la unión de la membrana nuclear a la lámina nuclear durante la división celular.

VKORC1, Este gen codifica la subunidad catalítica del complejo de vitamina K epóxido reductasa, que es responsable de la reducción de la vitamina K 2,3-epóxido inactiva a vitamina K activa en la membrana del retículo endoplásmico. La vitamina K es un cofactor necesario para la carboxilación de los residuos de ácido glutámico por la gamma-carboxilasa dependiente de vitamina K en las enzimas de coagulación de la sangre. La variación alélica en este gen está asociada con la deficiencia combinada de factores de coagulación dependientes de la vitamina K y una mayor resistencia o sensibilidad a la warfarina, un inhibidor de la epóxido reductasa de la vitamina K.

Los genes descritos fueron aquellos que se encontraron como portadores de mayor número de variantes alteradas por cada paciente, es claro que, aunque no son biológicamente direccionados al daño del cerebro y repercusión sobre el Alzheimer, el estar presentes en al menos 3 pacientes con diagnóstico, proveen historia frente a las enfermedades crónicas características en cada fenotipo.

Al tener en estudio una enfermedad crónica la susceptibilidad a su desarrollo es tan variable que, de todos los genes categorizados en los diferentes exomas, aquellos con “impacto medio o bajo” deben ser tenidos en cuenta, sean que estos tengan implicación biológica o no (tabla 16).

Es complejo determinar una asociación molecular directa frente al Alzheimer, la suma de efectos biológicos o interacción genotipo ambiente, hacen que se deba partir de los fenotipos de cada paciente, para de tal forma, hacer una asociación correcta de las variantes con impacto bajo, medio, moderadas e impacto alto (Tiwari 2023).

Si se observan estos genes, de acuerdo al enriquecimiento de Gene Ontology mediante KEGG y STRING, el APOE también interactúa con varias proteínas (figura 9) para desempeñar un papel en la oxidación de ácidos grasos y a múltiples genes que armonizan función en tejidos totalmente diferentes al sistema nervioso.

Sin embargo, al tener la cadena épsilon E4 en los pacientes, hace que las disfunciones de APOE pueden afectar el transporte de ácidos grasos y reducir la oxidación de los mismos, lo que resulta en la agregación de ácidos grasos en los astrocitos y el cerebro (Oi *et al* 2021)).

4.3 Genes con alteraciones, expresión diferencial.

Las figuras 11 – 14, muestran tanto el rasgo fenotipo como genotipo sobre la patología, los Heatmap clasificaron los genes según el número promedio de variantes por gen, ejemplo de ello aquellas que presentaron mayor impacto en el fenotipo del paciente.

Las variantes tipo missense fueron representativas en la mayoría de los genes. Aquellos con alto número de cambios fueron descritos en la figura 11, donde gran parte de estos genes Col6A2, Col11A2, ITPA, CYP21A2, VDR, GNB3, MYO1E, TOR1AIP1, F5, KCNJ11, POR, ABCB1, MTHFR, ERCC5, PRCD, L1G1, OPRM1, PLCB1, NEDD4L, TYR, SPTA1, PRF1, PCSK9, COL4A4, funcionan bajo mecanismos de señalización, metabolismo energético de integración y biosíntesis de colágeno.

Este tipo de acción génica a pesar de no todas las moléculas tener función directa al sistema nervioso central, el gen OPRM1, muestra patrones biológicos en procesos presinápticos y de regulación de canales neuronales.

Los genes CYP19A1, APOE, ISG15, ATIC, KDR, UGT2B7 y F2, fueron un grupo de genes que llamaron la atención dada la gran sobreexpresión en vías direccionadas a metabolismo de lípidos (HeatMap figura 12), este cluster génico confirma una vez más de que el metabolismo y el recambio entre estos genes a pesar de mantenerse dentro de la patología como “medianamente alterados” bloquean mecanismos intracelulares generando como resultado acumulación inadecuada de agentes biológicos tóxicos que precipiten la neurodegeneración.

Estudios realizados por Goyal 2023, concluyen que los problemas metabólicos con aparición a edades tempranas (diabetes, hipertensión, hipotiroidismo, triglicéridos y colesterol, problemas hormonales) generan deterioro cognitivo dado a que la producción de metabolitos en el cerebro cambia dinámicamente con el paso biológico del tiempo.

A pesar de muchos de los rasgos obtenidos, la alteración en la composición de genes con función receptora y lipídica, demuestran que las membranas de las células neuronales son básicamente una acumulación de lípidos y moléculas básicas que partir de los 18 genes determinados como biomarcadores (tabla 16) se pueden valorar independiente de su componente estructural básico. Es decir, se sabe que el metabolismo lipídico está inmerso en todo lo que conlleva a la regulación cerebral desde la formación de fosfolípidos, glucolípidos y colesterol, teniendo en cuenta todos estos genes descritos, los cuales participan en reacciones enzimáticas clave.

2.6.3 Patogenicidad Vs Asociación Fenotípica

La distribución de variantes dentro de los genes mostrados en la figura 14, concluyen este capítulo, siendo de gran importancia observar como los genes descritos desde el APOE hasta el CYP19A1 están involucrados en diversas asociaciones fenotípicas, desde variables como el sobrepeso, presión sanguínea, niveles de colesterol alterados, sobrepeso, etc. Ponen el sello patológico de cómo el depósito de varias proteínas es coadyuvante de la formación de placas seniles y ovillos neurofibrilares.

Con este estudio se confrontan definiciones amplias frente a la identificación de genes enriquecidos en vías de señalización de producción y transporte de lípidos, regulación hormonal y sinapsis

neuronal, siendo llevadas a que determinar la cantidad de expresión de proteínas al cerebro en relación a la mutación que cargue, es aún un abanico de variables y probabilidad de captura exacta.

2.7 CONCLUSIONES

- APOE4 contribuye a la patogenia de la EA al alterar la capacidad de respuesta celular, el transporte de lípidos, la integridad y plasticidad sináptica, el metabolismo de lípidos y la integridad cerebrovascular; siendo todos efectos independientes de las vías relacionadas con A β .
- Fueron 16 los genes encontrados con mayor densidad y/o variabilidad a nivel mutacional que afectan vías principales en procesos biológicos como metabolismo de lípidos, producción de metabolitos primarios, catabolismo y transporte celular.
- Los genes que presentaron mayor impacto a nivel funcional y que presentaron alteraciones patogénicas sobre vías metabólicas de interés a la homeostasis neuronal fueron: CYP19A1, APOE, ISG15, ATIC, KDR, UGT2B7 y F2
- Se identificaron 10 genes encontrados en los exomas analizados por paciente, estos en relación a presencia de problemas como hipertensión, alteración vascular, resistencia a fármacos y metabolismo anormal lipídico. Estos son referentes a los genes VDR, ERCCI, VKORCI, TOR1AIP1, KDR, COMT, ITPA, ISG15, EPHX2 y LIG1 .
- La suma de efectos biológicos e interacciones génicas encontradas en este estudio dan peso acerca de lo complejas que son las enfermedades crónicas y de como una asociación correcta y directa al desenlace de la patología continúa siendo blanco de investigación.

- El gen de la Apolipoproteína E es una molécula clave en todos los procesos de sinergismo metabólico, no solo al cerebro sino en cada función biológica de importancia, observándose el trabajo en conjunto con demás genes constitutivos.
- La identificación de asociaciones gen-rasgo ofrece nuevas perspectivas sobre el papel de estas biomoléculas en los distintos procesos fisiopatológicos que culminan en la EA, lo que puede conducir a la identificación de nuevos objetivos terapéuticos y de diagnóstico.
- El hallazgo de los genes CYP19A1, APOE, ISG15, ATIC, KDR, UGT2B7 Y F2, con alteraciones patogénicas a nivel metabólico, es una gran contribución al entendimiento de los procesos involucrados en la etiología del Alzheimer, para nuestra población sin embargo al ser este el primer estudio realizado, debe darse amplitud a la exploración de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

Abondio, P. et al. (2019). 'The genetic variability of APOE in different human populations and its implications for longevity', *Genes*, 10(3).

Beyer, K. (2002). Caracterización genética de la enfermedad de alzheimer : estudio poblacional. Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/4228/kb1de1.pdf;sequence=1> .

Gerdes, L. U. (2002). Some Epidemiological Aspects of The Common Genetic Polymorphism of Apolipoprotein E. Universidad de Aarhus. Recuperado de: https://pdfs.semanticscholar.org/7062/88a2cdefe9abf08a55caaa77b89aaa15b278.pdf?_ga=2.38564067.173221038.1585065605-985462058.1561113536.

González, R. D. et al. (2020). 'APOE Variants in an Iberian Alzheimer Cohort Detected through an Optimized Sanger Sequencing Protocol', *Genes*, 12(1), p. 4. doi: 10.3390/genes12010004.

Hixson, J. E. y Vernier, D. T. (1990). 'Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI', *Journal of Lipid Research*, 31, pp. 545–548. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/20813901_Restriction_isotyping_of_human_apolipoprotein_E_by_gene_amplification_and_cleavage_with_HhA1.

Rasmussen, K. L. et al. (2020). 'APOE and dementia – resequencing and genotyping in 105,597 individuals', *Alzheimer's and Dementia*, (February), pp. 1–14. doi: 10.1002/alz.12165.

Reiman, E. M. et al. (2020). 'Exceptionally low likelihood of Alzheimer's dementia in APOE2 homozygotes from a 5,000-person neuropathological study', *Nature Communications*, 11(1), p. 667. doi: 10.1038/s41467-019-14279-8.

Gerdes, L. U. (2002). *Some Epidemiological Aspects of The Common Genetic Polymorphism of Apolipoprotein E*. Universidad de Aarhus. Available at: https://pdfs.semanticscholar.org/7062/88a2cdefe9abf08a55caaa77b89aaa15b278.pdf?_ga=2.38564067.173221038.1585065605-985462058.1561113536.

Zhu, Z. et al. (2020). 'TOMM40 and APOE variants synergistically increase the risk of Alzheimer's disease in a Chinese population', *Aging Clinical and Experimental Research*. Springer International Publishing, (0123456789). doi: 10.1007/s40520-020-01661-6.

Flowers, S. A. y Rebeck, G. W. (2020). 'APOE in the normal brain', *Neurobiology of Disease*, 136, pp. 1–21. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104724.

Martínez-Magaña, J. J. et al. (2019). 'Association between APOE polymorphisms and lipid profile in Mexican Amerindian population', *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 7(11), pp. 1–9. doi: 10.1002/mgg3.958.

Husain, M. A; Laurent, B. y Plourde, M. (2021). 'APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics', *Frontiers in Neuroscience*, 15(February), pp. 1–15. doi: 10.3389/fnins.2021.630502.

Farrer L.A. (2022). Expanding the genomic roadmap of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14: 783–785.

Scarmeas N; Stern Y; Tang MX; Mayeux R; Luchsinger JA. (2006). Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*; 59:912e21

Gamba P; Staurenghi E; Testa G; Giannelli S; Sottero B; Leonarduzzi G. (2019). A crosstalk between brain cholesterol oxidation and glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*; 13:556.

Peng Y; Gao P; Shi L; Chen L; Liu J; Long J. (2020). Central and peripheral metabolic defects contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease: targeting mitochondria for diagnosis and prevention. *Antioxidants Redox Signal*;32:1188e236.

Liu Y; Zhong X; Shen J; Jiao L; Tong J; Zhao W; et al. (2020). Elevated serum TC and LDLC levels in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a metaanalysis study. *Brain Res*;1727:146554.

Zarrouk A; Debbabi M; Bezine M; Karym EM; Badreddine A; Rouaud O. et al. (2018). Lipid biomarkers in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*;15:303e12.

McGuinness B; Passmore P. (2010). Can statins prevent or help treat Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* ;20:925e33.

Fassbender K; Simons M; Bergmann C; Stroick M; Lutjohann D; Keller P. et al. (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*;98:5856e61.

Wolozin B; Kellman W; Ruosseau P; Celesia GG; Siegel G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* ;57:1439e43.

Fieldhouse JLP; Doorduijn AS; de Leeuw FA; Verhaar BJH; Koene T; Wesselman LMP. et al. (2020). A suboptimal diet is associated with poorer cognition: the NUDAD project. *Nutrients*;12.

Gamba P; Staurengi E; Testa G; Giannelli S; Sottero B; Leonarduzzi G. (2019). A crosstalk between brain cholesterol oxidation and glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*;13:556.

Husain, M. A; Laurent, B. y Plourde, M. (2021) ‘APOE and Alzheimer’s Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics’, *Frontiers in Neuroscience*, 15(February), pp. 1–15. doi: 10.3389/fnins.2021.630502.

Alzheimer's Association. (2023). Alzheimer’s disease facts and figures. Alzheimer’s Disease and Dementia. (n.d.).from <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures>

Rovner. (2020). Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 16, 391–460.

Repa JJ; Liang G;, Ou J, Bashmakov Y; Lobaccaro JM, Shimomura I, et al. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev*;14:2819e30.

Michikawa M. (2003). Cholesterol paradox: is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease? *J Neurosci Res*;72:141e6

Horton JD; Goldstein JL; Brown MS. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*;109:1125e31.

Sandoval-Hernandez AG; Buitrago L; Moreno H; Cardona-Gomez GP; Arboleda G. (2015). Role of liver X receptor in AD pathophysiology. PLoS One;10:e0145467.

Repa JJ; Liang G; Ou J; Bashmakov Y; Lobaccaro JM; Shimomura I, et al. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev;14:2819e30.

Livingston G; Sommerlad A; Orgeta V; Costafreda SG; Huntley J; Ames D. et al. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. Lancet; 390: 2673-734.

C. Bellenguez; B. Grenier-Boley JC; Lambert. (2020). Genetics of Alzheimer's disease: where we are, and where we are going. Current Opinion in Neurobiology. 61, págs. 40

Rudolph E. Tanzi. (2022). The Genetics of Alzheimer Diseases. Cold Spring Harbor Perspectives Medicine. pág.296

Wing-Yu Fu & Nancy Y. (2023). The role of genetic risk factors of Alzheimer's disease in synaptic dysfunction. Seminars in Cell and Developmental Biology.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.07.011>

Giri Mohan; Zhang Man, Lu Yang. (2016). Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. Clin Interv Aging. DOI: 10.2147/CIA.S105769

Dong. X; Zhang. L; Meng. Q;GAO. Q. (2022). Association Between *Interleukin-1A*, *Interleukin-1B*, and *Bridging integrator 1* Polymorphisms and Alzheimer's Disease: a standard and Cumulative Meta-analysis. Molecular Neurobiology.

Kim, DH; Gim, JA; Mishra, A; Lee, K; Cho, Y; Kim, HS. (2022). SNP analysis of genes related to cholesterol metabolism and associated with late-onset Alzheimer's disease. Genes Genome.

Guo, Yunfei; Ding, Xiaolei; Lyon Gholson & Wang Kai. (2015). SeqMule: automated pipeline for analysis of human exome/genome sequencing data. *Scientific Reports*.

Eid, A., Mhatre, I. y Richardson, J. R. (2019). 'Gene-environment interactions in Alzheimer's disease: A potential path to precision medicine', *Pharmacology and Therapeutics*.Elsevier Inc., 199, pp. 173–187. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.03.005.

Abondio, P. *et al.* 2019. 'The genetic variability of APOE in different human populations and its implications for longevity', *Genes*, 10(3). doi: 10.3390/genes10030222. Alzheimer's Association (2019) '2019 Alzheimer's disease facts and figures', *Alzheimer's & Dementia*. Elsevier Inc., 15(3), pp. 321–387. doi: 10.1016/j.jalz.2019.01.010.

Husain, M. A; Laurent, B. y Plourde, M. (2021). 'APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics', *Frontiers in Neuroscience*, 15(February), pp. 1–15. doi: 10.3389/fnins.2021.630502.

Zhu, Z. *et al.* (2020). 'TOMM40 and APOE variants synergistically increase the risk of Alzheimer's disease in a Chinese population', *Aging Clinical and Experimental Research*. Springer International Publishing, (0123456789). doi: 10.1007/s40520-020-01661-6.

Moreno, D. J. *et al.* (2017). 'Association of GWAS Top Genes with Late-Onset Alzheimer's Disease in Colombian Population', *American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias*, 32(1), pp. 27–35. doi: 10.1177/1533317516679303.

Serrano-Pozo, A; Das, Sudeshna; Hyman, Bradley T. (2021). *APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches*. *The Lancet Neurology*, 20(1), 68–80. doi:10.1016/S1474-4422(20)30412-9

Eisenberg DTA; Kuzawa CW; M. Hayes G. (2010). Worldwide Allele Frequencies of the Human Apolipoprotein E Gene: Climate, Local Adaptations, and Evolutionary History. *American journal of physical anthropology* 2010; 143: 100–111.

Singh PP; Singh M, Mastana SS. (2016). APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Annals of Human Biology*; 33 (3): 279-308.

Velez-Pardo C; Rojas W, Jimenes-Del-Rio M; Bedoya G.(2014). Distribution of APOE polymorphism in the “Paisa” population from northwest Colombia (Antioquia). *Annals of Human Biology*. DOI: 10.3109/03014460.2014.932846

Perdomo. V.A. (2013). Análisis de Polimorfismos Asociados Al Gen de Apolipoproteína E y su Distribución en Poblaciones del Sur Occidente y Centro Colombiano. Tesis de Maestría. Cali-Colombia. Biblioteca Mario Carvajal, Universidad del Valle. [CD-ROM].

DISCUSIÓN GENERAL

La arquitectura genética de la EA es sumamente compleja, siendo necesario no solo partir de genes únicos ya documentados como el APOE, sino del empleo de variedad de estrategias moleculares que permitan brindar conclusiones acertadas.

A partir de este estudio, se rectificó que una población con un “background étnico” tan amplio como la vallecaucana presenta una genética susceptible a patologías crónicas que con la edad desencadenan enfermedades atroces como la demencia.

Al estudiar dos componentes génicos de gran importancia como lo fue caracterizar el gen APOE en población no afectada por la demencia, pero sí susceptible por el patrón de frecuencias alélicas y genotípicas del mismo (capítulo 1) llevó a tener que corroborar cómo el dosaje de estos alelos efectivamente eran clave en el desarrollo de la enfermedad.

Aunque llegar a conclusiones moleculares frente al panorama neurodegenerativo es laborioso, fue posible predecir la direccionalidad o expresión diferencial entre genes que elevan factores de riesgo no solamente a Alzheimer o como en alguno de los casos obtenidos, genes que no tienen vía metabólica directa al daño neuronal, pero que al estar presentes y con un contenido elevado de variantes altamente modificadoras en las proteínas, generaban aparición de otros fenotipos patológicos que desencadenaban efecto de suma o sinergismo biológico sobre el cerebro, siendo crucial el estudio de los análisis WES en todo paciente codificado con al menos una copia de E4. Es allí donde este trabajo tuvo complementos excelentes, los cuales permitieron tomar dos poblaciones totalmente diferentes, pero con un linaje cercano y a partir de esa diferenciación local, estructura poblacional y demás factores de diferenciación como la deriva génica, la selección local, el aislamiento por distancia y

demás, se logró analizar un marcador crítico no solo a nivel de la homeostasis celular, sino crítico a muchas otras moléculas que trabajan bajo la presión de las variables ahora descritas.

Expandir análisis moleculares a mayor escala permitiría el mejoramiento de análisis de asociación múltiple, cuando se tienen varias poblaciones. En primer lugar, las variantes genéticas que son raras o inexistentes en una población pueden ser más frecuentes en otra población, lo que permite descubrir variantes de riesgo específicas de la ascendencia o enriquecidas por su ancestría. Además, las interacciones entre el gen y el factor ambiental específico de la población pueden dar lugar a efectos genéticos específicos de la ascendencia que resaltan vías novedosas.

Como enfermedad progresiva e irreversible que afecta la vida social, laboral, familiar y personal de quien la padece, genera en los individuos afectados por la patología, atención exhaustiva por sus familias, siendo ellos quienes deben afrontar el manejo del paciente y entender cada etapa de avance de la misma, lo cual no es sencillo, porque el grado de dependencia del afectado va avanzando conforme evoluciona la enfermedad. Una sola persona no puede asumir el cuidado del paciente, la familia debe por lo tanto planear el manejo de la enfermedad desde diferentes aspectos: El *social*, el *médico* y el *económico*.

CONCLUSIONES GENERALES

- La alta frecuencia del alelo E4 = 21,41% del gen APOE en población afrodescendiente de Buenaventura, da indicios substanciales de predisposición a enfermedades crónicas como la diabetes, la hipercolesterolemia y la hipertensión, las cuales pueden conducir a desarrollo de demencia tipo Alzheimer dado el estilo de vida de esta región del pacífico colombiano.
- La identificación de los genes CYP19A1, APOE, ISG15, ATIC, KDR, UGT2B7, F2 VDR, ERCCI, VKORCI, TOR1AIP1, COMT, ITPA, ISG15, EPHX2 y LIG1 permite comprender y visualizar la dinámica molecular inmersa en una patología tan compleja como el Alzheimer, esto en referencia a los sitios de acción celular en los que intervienen a nivel funcional cada uno de estos genes, y aunque siendo diferente, son partícipes de deterioro cognitivo con la edad y el estilo de vida.
- Las poblaciones humanas de Colombia son altamente susceptibles a enfermedades crónicas, ejemplo el Alzheimer, como consecuencia de los patrones genéticos modificables por el efecto fenotipo – ambiente lo cual genera distribución variable de genes como el APOE, dando evidencia de que este marcador presenta una respuesta biológica contemporánea a la diversidad genética de las mismas.
- La contribución genética del Alzheimer, estima que los factores de riesgo ambientales y del estilo de vida explican el 29 % de la variación fenotípica. sin embargo, su impacto en el contexto de la responsabilidad genética de la EA sigue siendo en gran parte desconocido. Los estudios integradores grandes y diversos que combinan genética, multiómica, factores de

riesgo del estilo de vida y determinantes sociales de la salud serán cruciales para la comprensión patobiológica de la EA y el descubrimiento terapéutico equitativo.

- Teniendo en cuenta que la expectativa de vida de la población humana cada vez va en aumento y que en consecuencia la enfermedad de Alzheimer se convierte en un problema importante de salud pública este trabajo contribuye en la búsqueda de soluciones a esta problemática en términos de mostrar la importancia de poder hacer un diagnóstico oportuno de las personas y familias en riesgo de sufrir a futuro de esta patología, realizar adecuados procesos de consejería genética a las familias a riesgo y aportar a la comunidad médica y científica para la mejora del tratamiento integral de este tipo de pacientes.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

Abondio, P. et al. (2019). ‘The genetic variability of APOE in different human populations and its implications for longevity’, *Genes*, 10(3). 10.3390/genes10030222

Alzheimer's Association. (2023). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Disease and Dementia*. (n.d.).from <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures>

Bao, M., & Jiang, G. (2019). Differential expression and functional analysis of lungcancer gene expression datasets: A systems biology perspective. *Oncology Letters*, 18(1), 776–782. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10362>

Beyer, K. (2002). Caracterización genética de la enfermedad de alzheimer : estudio poblacional. Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/4228/kb1de1.pdf;sequence=1> .

Bellenguez; C; Grenier-Boley JC; Lambert. (2020). Genetics of Alzheimer's disease: where we are, and where we are going. Current Opinion in Neurobiology. 61, págs. 40

Callas N; Poveda E; Baracaldo CM; Hernández P; Castillo C; Guerra M. (2017). Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en un grupo de Escolares del Centro-oriente colombiano: Comparación con las concentraciones plasmáticas de lípidos y apolipoproteínas. *Biomédica*; 27:526-36.

Carvajal-Carmona LG; Soto ID; Pineda N. et al. (2000). Strong Amerind/white sex bias and a possible Sephardic contribution among the founders of a population in northwest Colombia. *Am J Hum Genet* ;67:1287-95

DANE. (2005). Boletín censo general 2005. Perfil Buenaventura. Recuperado de: <https://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL.PDF.CG2005/76109T7T000.PDE>

Dong. X; Zhang. L; Meng. Q; Gao. Q. (2022). Association Between *Interleukin-1A*, *Interleukin-1B*, and *Bridging integrator 1* Polymorphisms and Alzheimer's Disease: a standard and Cumulative Meta-analysis. *Molecular Neurobiology*.

Eid, A., Mhatre, I. y Richardson, J. R. (2019). 'Gene-environment interactions in Alzheimer's disease: A potential path to precision medicine', *Pharmacology and Therapeutics*.Elsevier Inc., 199, pp. 173–187. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.03.005.

Eisenberg DTA; Kuzawa CW; M. Hayes G. (2010). Worldwide Allele Frequencies of the Human Apolipoprotein E Gene: Climate, Local Adaptations, and Evolutionary History. *American journal of physical anthropology* 2010; 143: 100–111.

Eisenberg DTA;Kuzawa CW; Hayes MG. (2010). Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history. *Am J Phys Anthro*; 143:100-11.

Excoffier, L, & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5. 2010. A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. ; 10:564-7.

Farrer L.A. (2022). Expanding the genomic roadmap of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*

Fassbender K; Simons M; Bergmann C; Stroick M; Lutjohann D; Keller P. et al. (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*;98:5856e61.

Fieldhouse JLP; Doorduijn AS; de Leeuw FA; Verhaar BJH; Koene T; Wesselman LMP. et al. (2020). A suboptimal diet is associated with poorer cognition: the NUDAD project. *Nutrients*;12.

Flowers, S. A. y Rebeck, G. W. (2020). 'APOE in the normal brain', *Neurobiology of Disease*, 136, pp. 1–21. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104724.

Forero DA; Pinzón J; Arboleda GH; Yunis JJ; Alvarez C; Cataño N; Arboleda H. (2006). Analysis of Common Polymorphisms in Angiotensin-converting Enzyme and Apolipoprotein E Genes and Human Longevity in Colombia. *Archives of Medical Research*; 37 (7): 890-894.

Gamba P; Staurengi E; Testa G; Giannelli S; Sottero B; Leonarduzzi G. (2019). A crosstalk between brain cholesterol oxidation and glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*; 13:556.

Gamba P; Staurengi E; Testa G; Giannelli S; Sottero B; Leonarduzzi G. (2019). A crosstalk between brain cholesterol oxidation and glucose metabolism in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*;13:556.

Gerdes, L. U. (2002). Some Epidemiological Aspects of The Common Genetic Polymorphism of Apolipoprotein E. Universidad de Aarhus. Recuperado de:

https://pdfs.semanticscholar.org/7062/88a2cdefe9abf08a55caaa77b89aaa15b278.pdf?_ga=2.38564067.173221038.1585065605-985462058.1561113536.

Gerdes, L. U. (2002). Some Epidemiological Aspects of The Common Genetic Polymorphism of Apolipoprotein E. Universidad de Aarhus. Available at: https://pdfs.semanticscholar.org/7062/88a2cdefe9abf08a55caaa77b89aaa15b278.pdf?_ga=2.38564067.173221038.1585065605-985462058.1561113536.

Giri Mohan; Zhang Man, Lu Yang. (2016). Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. Clin Interv Aging. DOI: 10.2147/CIA.S105769

González, R. D. et al. (2020). ‘APOE Variants in an Iberian Alzheimer Cohort Detected through an Optimized Sanger Sequencing Protocol’, Genes, 12(1), p. 4. doi: 10.3390/genes12010004.

Guo, Yunfei; Ding, Xiaolei; Lyon Gholson & Wang Kai. (2015). SeqMule: automated pipeline for analysis of human exome/genome sequencing data. *Scientific Reports*.

Hixson, J. E. y Vernier, D. T. (1990). ‘Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI’, Journal of Lipid Research, 31, pp. 545–548. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/20813901_Restriction_isotyping_of_human_apolipoprotein_E_by_gene_amplification_and_cleavage_with_HhA1.

Horton JD; Goldstein JL; Brown MS. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*;109:1125e31.

Huang P, Hsieh SW, Chang YH, Hour AL, Chen HY, Liu CK. (2017). Differences in the frequency of Alzheimer's disease-associated genomic variations in populations of different races. *Geriatr Gerontol Int* ;17:2184-93.

Husain, M. A; Laurent, B. y Plourde, M. (2021). 'APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics', *Frontiers in Neuroscience*, 15(February), pp. 1–15. doi: 10.3389/fnins.2021.630502.

Husain, M. A; Laurent, B. y Plourde, M. (2021). 'APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics', *Frontiers in Neuroscience*, 15(February), pp. 1–15. doi: 10.3389/fnins.2021.630502.

Jaramillo-Correa JP; Keyeux G; Ruiz-Garcia M; Rodas C; Bernal J. (2001). Population Genetic Analysis of the Genes APOE, APOB (3'VNTR) and ACE in Some Black and Amerindian Communities from Colombia. *Human Heredity*; 52 (1): 14-33.

Kim, DH; Gim, JA; Mishra, A; Lee, K; Cho, Y; Kim, HS. (2022). SNP analysis of genes related to cholesterol metabolism and associated with late-onset Alzheimer's disease. *Genes Genome*.

Kockx M, Jessup W, Kritharides L. (2008). Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2008) 28:1060–7. 10.1161/ATVBAHA.108.164350

Landázuri P; Loango N, Gallego ML; Restrepo B. (2009). Diferencias de sexo, edad y lípidos plasmáticos asociadas al polimorfismo de la apolipoproteína E en un grupo de escolares de Quindío, Colombia. *Biomédica*; 29 (3): 381-391.

Liu Y; Zhong X; Shen J; Jiao L; Tong J; Zhao W; et al. (2020). Elevated serum TC and LDLC levels in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a metaanalysis study. *Brain Res*;1727:146554.

Livingston G; Sommerlad A; Orgeta V; Costafreda SG; Huntley J; Ames D. et al. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet*; 390: 2673-734.

Marcheco B; Rodríguez JL; Mckeigue P. et al. (2011). Interactions between genetic admixture, ethnic identity, APOE genotype and dementia prevalence in an admixed Cuban sample; across sectional population survey and nested case-control study. *BMC Med Genet*; 12:43

Martínez-Magaña, J. J. et al. (2019). ‘Association between APOE polymorphisms and lipid profile in Mexican Amerindian population’, *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 7(11), pp. 1–9. doi: 10.1002/mgg3.958.

McGuinness B; Passmore P. (2010). Can statins prevent or help treat Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* ;20:925e33.

Michikawa M. (2003). Cholesterol paradox: is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease? *J Neurosci Res*;72:141e6

Moreno, D. J. *et al.* (2017). 'Association of GWAS Top Genes with Late-Onset Alzheimer's Disease in Colombian Population', *American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias*, 32(1), pp. 27–35. doi: 10.1177/1533317516679303.

Peng Y; Gao P; Shi L; Chen L; Liu J; Long J. (2020). Central and peripheral metabolic defects contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease: targeting mitochondria for diagnosis and prevention. *Antioxidants Redox Signal*;32:1188e236.

Perdomo. V.A. (2013). Análisis de Polimorfismos Asociados Al Gen de Apolipoproteína E y su Distribución en Poblaciones del Sur Occidente y Centro Colombiano. Tesis de Maestría. Cali-Colombia. Biblioteca Mario Carvajal, Universidad del Valle.

Qi G, Mi Y, Shi X, Gu H, Brinton RD, Yin F. (2021). ApoE4 impairs neuron-astrocyte coupling of fatty acid metabolism. *Cell*. 34:108572. 10.1016/j.celrep.2020.108572

Rasmussen, K. L. et al. (2020). 'APOE and dementia – resequencing and genotyping in 105,597 individuals', *Alzheimer's and Dementia*, (February), pp. 1–14. doi: 10.1002/alz.12165.

Reiman, E. M. et al. (2020). 'Exceptionally low likelihood of Alzheimer's dementia in APOE2 homozygotes from a 5,000-person neuropathological study', *Nature Communications*, 11(1), p. 667. doi: 10.1038/s41467-019-14279-8.

Repa JJ; Liang G; Ou J; Bashmakov Y; Lobaccaro JM; Shimomura I, et al. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev*;14:2819e30.

Rovner. (2020). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 16, 391–460.

Rudolph E. Tanzi. (2022). The Genetics of Alzheimer Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives Medicine*. pág.296

Sandoval-Hernandez AG; Buitrago L; Moreno H; Cardona-Gomez GP; Arboleda G. (2015). Role of liver X receptor in AD pathophysiology. *PLoS One*;10:e0145467.

Scarmeas N; Stern Y; Tang MX; Mayeux R; Luchsinger JA. (2006). Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*; 59:912e21

Serrano-Pozo, A; Das, Sudeshna; Hyman, Bradley T. (2021). *APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. The Lancet Neurology*, 20(1), 68–80. doi:10.1016/S1474-4422(20)30412-9

Singh PP; Singh M, Mastana SS. (2016). APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Annals of Human Biology*; 33 (3): 279-308.

Tiwari. V. (2023). Lipidomics and proteomics: An integrative approach for early diagnosis of dementia and Alzheimer's disease.. *Front Genetics*. doi: 10.3389/fgene.2023.1057068

Velez-Pardo C; Rojas W; Jimenes-Del-Rio M; Bedoya G.(2014). Distribution of APOE polymorphism in the “Paisa” population from northwest Colombia (Antioquia). *Annals of Human Biology*. DOI: 10.3109/03014460.2014.932846

Wing-Yu Fu & Nancy Y. (2023). The role of genetic risk factors of Alzheimer's disease in synaptic dysfunction. *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.07.011>

Wolozin B; Kellman W; Ruosseau P; Celesia GG; Siegel G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* ;57:1439e43.

Zarrouk A; Debbabi M; Bezine M; Karym EM; Badreddine A; Rouaud O. et al. (2018). Lipid biomarkers in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*;15:303e12.

Zhu, Z. *et al.* (2020). 'TOMM40 and APOE variants synergistically increase the risk of Alzheimer's disease in a Chinese population', *Aging Clinical and Experimental Research*. Springer International Publishing, (0123456789). doi: 10.1007/s40520-020-01661-6.

ANEXO 1

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana

Facultad de Salud



ACTA DE APROBACIÓN N° 022-018

Proyecto: **"IDENTIFICACIÓN DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS A SUSCEPTIBILIDAD DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER"**

Sometido por: **VIVIAN ANDREA PERDOMO / GUILLERMO BARRETO**

Código Interno: **242-018** Fecha en que fue sometido: **17** **12** **2018**

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité **certifica que:**

1. Sus miembros revisaron los siguientes **documentos** del presente proyecto:

☒	Protocolo de investigación	☒	Instrumento de recolección de datos
☒	Formato de consentimiento informado	☒	Soportes solicitados por el CIREH
☒	Cartas de las instituciones participantes	☐	Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité.

3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo:**

☐ SIN RIESGO ☒ RIESGO MÍNIMO ☐ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

4. Las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.

5. La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio es adecuada.

6. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:

- Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
- Lesiones a sujetos humanos.
- Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- Cualquier cambio o modificación a este proyecto que no haya sido revisado y aprobado por el Comité.

7. El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de un **(1) año** a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

8. El **investigador principal** deberá informar al Comité:

- a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
- b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
- c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente.
- d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
- e. cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
- f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
- g. El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán solicitar la renovación del aval adjuntando los documentos solicitados por el Cireh.

Firma:



Nombre:

**MARIA FLORENCIA VELASCO DE
MARTINEZ**

Capacidad
representativa:

PRESIDENTE

Fecha:

05

06

2019

Teléfono: **5185677**

Cali, 21 de Mayo de 2019

Señores
FAMILIA FUNDACIÓN ALZHEIMER
La ciudad

Asunto: Participación en investigación sobre la enfermedad de Alzheimer realizada por la Universidad del Valle

Estimadas familias, cordial saludo.

El grupo de Investigación en "Genética Molecular Humana" de la Universidad del Valle, (código Colciencias 0005412), en asocio con la Fundación Alzheimer de Cali, estamos realizando el proyecto de investigación **"Identificación de regiones genómicas asociadas a susceptibilidad de la enfermedad de Alzheimer"** con el objetivo de identificar mutaciones a nivel de ADN que estén asociadas con la aparición y avance de esta enfermedad.

La importancia del proyecto en mención radica en la generación de herramientas que permitan realizar un diagnóstico temprano y en la identificación de rutas metabólicas que al estar alteradas comprometen procesos neurobiológicos en los afectados que pueden desencadenar en esta enfermedad. La identificación a edades tempranas de personas que puedan tener una predisposición genética a Alzheimer puede ayudar enormemente al manejo clínico de esta patología con los consecuentes beneficios para el paciente y su entorno familiar.

Con la presente, comedidamente los estamos invitando a participar en este proyecto. Para esto, solicitamos su presencia el próximo **Sábado 1 de Junio a las 9 am** en las instalaciones de la Fundación Alzheimer donde les estaremos complementado la información relacionada con el proyecto.

Su participación en este proyecto consiste en realizar una toma de muestra de sangre y en su defecto de raspado bucal, muestra que si ustedes lo aceptan se estaría tomando el mismo día Sábado. Es importante señalar que esta actividad no conlleva a ningún tipo de costo por parte de ustedes como familia ni para el paciente y tampoco para la Fundación, los costos de esta investigación son asumidos por la Universidad del Valle.

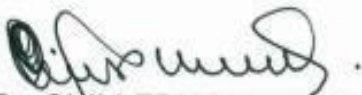
Diagnóstico Molecular - Determinación de Paternidad

Universidad del Valle - Facultad de Ciencias - Sección Genética
Ciudad Universitaria Meléndez - Edif 320 Ofic. 4040 - A. A. 25360
Teléfonos: 321 2152 - 339 3243
e-mail: lab.geneticahumana@univalle.edu.co
Santiago de Cali - Colombia

Los resultados de los exámenes de ADN serán entregados a cada paciente y su familia en particular y, cuando sea el caso, se realizará un adecuado proceso de consejería genética.

Estamos investigando con las herramientas aportadas por la genética esta compleja patología. Su participación es muy valiosa para el éxito de este proyecto, así es que, los esperamos el Sábado 1 de Junio en la Fundación.

Reciban un cordial saludo,



Dr. GUILLERMO BARRETO, PhD

Genetista, Director del Grupo de Investigación en Genética Molecular Humana
Profesor Titular, Sección Genética, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle



VIVIAN ANDREA PERDOMO, MSc

Estudiante del Doctorado en Ciencias Biología
Integrante del Grupo de Investigación en Genética Molecular Humana
Universidad del Valle



Dra. JACQUELINE ARABIA BURAYE

Directora Fundación Alzheimer



REVISTA COLOMBIANA DE
PSIQUIATRÍA

www.elsevier.es/rcp



Original Article

Polymorphisms of apolipoprotein E in the
Afro-descendant population of Buenaventura,
Colombia



Vivian Andrea Perdomo, Diana Carolina Ortega, Guillermo Barreto*

Grupo de Genética Molecular Humana, Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2019

Accepted 5 October 2020

Available online 13 December 2020

Keywords:

Apolipoprotein E

ApoE4

Alzheimer's disease

Colombian Afro-descendant
population

ABSTRACT

Objetives: To estimate the frequency distribution, both allelic and genotypic, of the APOE gene in the Afro-descendant population of Buenaventura, Colombia.

Methods: Three hundred and forty-eight Afro-descendant individuals were analysed and the APOE locus was genotyped by PCR-RFLP. The allelic and genotypic frequencies were established by direct counting and the Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated through χ^2 test. The frequencies obtained in this study were compared with frequencies reported for other Colombian populations through the Fisher's exact test.

Results: The following allelic frequencies were observed: E3, 70.8%; E4, 21.4%, and E2, 7.8%. The genotypic frequencies were: E3/E3, 51.1%; E3/E4, 27.3%; E2/E3, 12.1%; E4/E4, 6%; E2/E4, 3.5%, and E2/E2, 0%. The entire examined population was found in Hardy-Weinberg equilibrium ($P = .074$), and significant differences were found in the allele E4 when comparing this population with the Amerindian and mestizo populations of Bogotá, Quindío, Centro-Oriente, Valle del Cauca, Barranquilla and Medellín ($P \leq 0.0345$).

Conclusions: The allelic frequencies observed in this study were significantly different from the frequencies reported in other Colombian populations. The high representativeness of the E4 and E2 alleles validates the hypothesis that there are micro-evolutionary processes that have been acting on their frequencies and could be associated with susceptibility to neuropsychiatric diseases such as Alzheimer's disease, metabolic alterations of fats and/or coronary artery disease.

© 2020 Asociación Colombiana de Psiquiatría. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

PRESENTACIÓN EN CONGRESO



11 AL 14
DE MAYO 2021

Se certifica que **Vivian Andrea Perdomo Díaz**

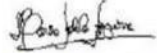
ha participado en el **IV SIMPOSIO INTERNACIONAL DE AMILOIDOSIS,**

Buenos Aires, 11 al 14 de mayo de 2021.


Dra. Elsa Nucifora
Presidente del Simposio

GEA Grupo de Estudio
de Amiloidosis




Dra. María Adela Aguirre
Comité Organizador

"Ambientes virtuales en investigación y desarrollo de las Ciencias Biológicas"

VIVIAN ANDREA PERDOMO DÍAZ

PONENTE

Dr. Lina Moreno

F. D.