



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

Determinación de los genotipos del polimorfismo rs4986791 del gen TLR4 y su correlación con los genotipos de los polimorfismos rs429358 Y rs7412 del gen APOE en pacientes con enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Ricardo Romero como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutores:

Dra. Mercedes Fernández-Mestre

Dra. Guillermina Alonso

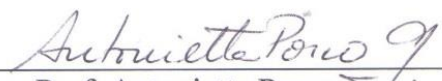
Caracas, Venezuela

Octubre 2016

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL Br. RICARDO ROMERO**

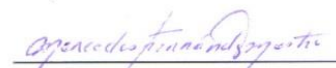
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. RICARDO ROMERO, C.I: 20093640, titulado **“Determinación de los genotipos del polimorfismo rs4986791 del gen TLR4 y su correlación con los genotipos de los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen APOE en pacientes con enfermedad de Alzheimer de inicio tardío”**, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veintitrés días del mes de noviembre del año 2016, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como coordinadora del jurado examinador.


Prof. Antonietta Porco


Prof. Victoria Navas


Prof. Guillermina Alonso
(Tutor - Coordinador)


Prof. Mercedes Fernández
(Tutor)



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 18/01/2016, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado del bachiller **Romero M., Ricardo D.**; titular de la cédula de identidad No.; 20.093.640, titulado: **"Determinación de los genotipos del polimorfismo rs4986791 del gen TLR4 y su correlación con los genotipos de los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen APOE en pacientes con enfermedad de Alzheimer de inicio tardío"**; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los veinte días del mes de enero del año dos mil diecisiete.



Dr. Jesús Guillermo Romero Muñoz
Presidente de
Consejo de la Escuela de Biología

/br.-

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa, cuyas características histopatológicas son la acumulación extracelular de agregados de péptido β amiloide ($A\beta$) y la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares. A pesar de que los mecanismos responsables de la manifestación de la enfermedad no han sido dilucidados, recientemente se formó un consenso en que la inflamación juega un papel importante. En el sistema nervioso central, los mecanismos de inflamación son llevados a cabo principalmente por las microglías, las cuales median la inflamación a través de moléculas asociadas a daño celular o receptores capaces de reconocer moléculas asociadas a patógenos (TLRs). Varios estudios sugieren que el TLR4 participa en la patología de la EA, bien sea ayudando en la remoción de los depósitos del $A\beta$, o bien promoviendo la neurodegeneración por la liberación de moléculas citotóxicas debido a respuestas inflamatorias exacerbadas. Se han identificado varios polimorfismos de un solo nucleótido en el gen *TLR4*, generando dos de ellos un cambio no sinónimo en la secuencia de aminoácidos: +896A/G (*rs4986790*) y +1196C/T (*rs4986791*). Estos polimorfismos han sido asociados con susceptibilidad a diversas enfermedades asociadas con la edad. Cabe destacar, que uno de los factores genéticos de susceptibilidad a desarrollar la EA de inicio tardío es la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (*APOE*), el cual codifica la isoforma apoE4. La apolipoproteína E se une ávidamente y de una manera isoforma específica al péptido $A\beta$, un componente importante de la placa senil en la EA. Esta interacción es dependiente del arreglo del βA en una conformación de lámina β , promoviendo la formación y agregación de las fibras de $A\beta$. Fundamentados en que la asociación del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* con el desarrollo de la EA de aparición tardía es una de las

más fuertes y que diferentes estudios han propuesto que *TLR4* participa en la patología de esta enfermedad nos planteamos el siguiente objetivo: Estudiar el polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* y su correlación con los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen *APOE* en pacientes con enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Para alcanzar dicho objetivo se analizó el ADN, obtenido de muestras de sangre periférica, de 61 pacientes con EA (casos) y 102 individuos aparentemente sanos (controles) genotipificados para los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen *APOE*. El polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* se determinó mediante PCR-SSP (iniciadores de secuencias específicas). Las frecuencias se estimaron por conteo directo, las diferencias entre los grupos se evaluó por la prueba exacta de Fisher. Al establecer comparaciones entre los grupos, no se observó asociación entre la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío y el polimorfismo rs429358 del gen *TLR4* ($p = 0,0007$; OR = 0,35). Sin embargo, se confirmó que el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* está asociado con el desarrollo de la EA de inicio tardío.

Palabras claves: *TLR4*, Alzheimer, apolipoproteína E, polimorfismo, SSP-PCR,

ABREVIACIONES

a:a Aminoácidos
ADN = Ácido desoxirribonucleico
AP1 = Proteína activadora 1(factor de transcripción)
APOE = Apolipoproteína E
ARN= Ácido ribonucleico
A β = Péptido beta amiloide
BACE1= Beta-secretasa 1
CD = Cluster (grupo) de Diferenciación
DAMPs = Patrones moleculares asociados a daño
EA = Enfermedad de Alzheimer
EAOD = Enfermedad de Alzheimer esporádico de inicio temprano
 ε = Épsilon
ERK = Cinasas reguladas por señales extracelulares
FA= Frecuencia Alélica
FG= Frecuencia Genotípica
HSP = Proteína de choque térmico
H-W = Hardy-Weinberg
IFN = Interferón
IFN β = Interferón beta
IFN α = Interferón alfa
IKKs = Cinasas I κ B
IL-1 = Interleuquina 1
IRAK = Cinasa asociada al receptor de Interleuquina
IRF = Factor regulador de IFN
I κ B = Factor Nuclear de la cadena kappa
JNK = Cinasas c-Jun N-terminal
LOAD = Enfermedad de Alzheimer esporádico de inicio tardío
LPS = Lipopolisacárido
LRR = Repeticiones ricas en leucina
MAPK = Proteína cinasa activada por mitógeno
MD2 = Proteína de diferenciación mieloide 2
MPL = Monofosforil lípido A
MyD88 = Proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
N= número de individuos
NF- κ B = Factor nuclear kappa B
NH₄= Amonio
NLB = Buffer de lisis nuclear

NLR = Receptores tipo NOD
OR = Odds Ratio (relación de probabilidades)
p38 = MAP cinasa
PAMPs = Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR = reacción en cadena de la polimerasa
PPA = Proteína precursora del amiloide
PRRs = Receptores de reconocimiento de patrones
PSEN1 = Presenilina 1
PSEN2 = Presenilina 2
RAGE= Receptor de productos avanzados de glicosilación terminal
RCLB = Buffer de lisis de células rojas
RLR = Receptores tipo RIG-I
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SNC = Sistema nervioso central
SNP = Sistema nervioso periférico/ Polimorfismo de un solo nucleótido
SSP = iniciador de secuencia específica
TAB = Proteína unidora de TAK
TAK = Proteína cinasa de la familia MLK
TIR = Receptor Toll/IL-1
TIRAP = Proteína adaptadora con dominio TIR
TLR = Receptor tipo toll
TNF = Factor de Necrosis Tumoral
TRAF = Factor asociado al receptor de TNF
TRAM = Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF = Adaptador con dominio TIR inductor de Interferón- β

AGRADECIMIENTO

Debo agradecer, en general, a todos aquellos seres extraños que eligieron quedarse en un país, hostil a toda muestra de inteligencia, a enseñar y hacer ciencias, así les tocase enseñarla y hacerla con las uñas.

Especialmente a la Doctora Mercedes Fernandes; pilar fundamental de este trabajo, por el apoyo y su asesoría. Además, su integridad, responsabilidad y amor a su trabajo sirvieron de ejemplo no sólo para mí, sino a todos los que hicieron vida en su laboratorio. También agradezco al grupo que compuso el laboratorio de genética humana: Eva, Omar, Fernando, Violeta, Fredy, Marilian, Daniela, Eloísa y María Teresa; por toda la ayuda y por soportar las molestias que una persona tan introvertida y huraña como yo puede generar.

Otro agradecimiento va dirigido a la profesora Guillermina Alonso, cuya innegable destreza para sacar alumnos del atolladero permitió que este trabajo se entregara en los plazos adecuados.

Está dedicatoria no puede pasar por alto los nombres de la Dra. Zoraida Díaz y su grupo de trabajo del Instituto de Medicina Tropical (Arturo Muños y la Dra. Belkys Noya) y el de Alexander Laurentín; cuyos conocimientos y métodos de trabajo fueron un andamiaje sólido en mi formación académica.

Y por último, no me alcanzarían palabras para agradecer el apoyo y sacrificio de mi señora madre, Gloria Romero, de estos años. Principalmente por brindarme la mejor educación que se pudo conseguir en nuestra limitada clase media, e inculcarme la pasión por la lectura y el afán por aprender.

La trágica situación del país hace imposible no hacer mención de aquellos mártires de la libertad cuya vida fue segada por la hoz del

Estado: Jairo Ortiz, Daniel Queliz, Miguel Ángel Colmenares, Brayan Principal, Gruseney Calderón, Carlos Moreno, Paola Ramírez, Mervins Guitian, Ramón Martínez, Renzo Rodríguez Roda, Jesús Sulbarán, Luis Alberto Márquez, Johan Medina, Christian Humberto Ochoa Soriano, Juan Pablo Pernaleté, Eyker Daniel Rojas, Ángel Enrique Moreira González, Armando Cañizales Carrillo, Luis Eloy Pacheco, Hecder Lugo Pérez, Anderson Enrique Dugarte, Miguel Castillo, Luis José Alviarez Chacón, Diego Hernández, Yeison Mora Castillo, Diego Fernando Arellano, José Francisco Guerrero. Paz a sus restos.

El objetivo del liberalismo es la cooperación pacífica entre todos los hombres y entre todas las naciones. Cuando hay propiedad privada de los medios de producción en todas partes y cuando las leyes, los tribunales y la administración tratan a nativos y a extranjeros en iguales términos, es de poca importancia donde estén marcadas las fronteras de un país...la guerra ya no compensa; no hay motivo para la agresión...todas las naciones pueden coexistir pacíficamente.

Ludwing Von Mises

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Composición de los alelos y Genotipos APOE	19
Tabla II. Secuencias de los iniciadores utilizados para la determinación de la variante rs4986791 del gen TLR4.....	33
Tabla III. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos.....	38
Tabla IV. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4986791 del gen TLR4 en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos.....	39
Tabla V. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen APOE en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos.....	41
TABLA VI. Frecuencias de las combinaciones genotípicas TLR4/APOE en pacientes con EA e individuos sanos.....	36
Tabla VII. Frecuencia de los genotipos del polimorfismo rs4986791 del gen TLR4 en distintas poblaciones.....	37
Tabla VIII. Comparaciones de frecuencias del genotipo TLR4/alelo APOE entre pacientes y controles.....	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de un cerebro humano normal y uno afectado por la EA.....	2
Figura 2. Procesamiento de la PPA en individuos sanos y pacientes con EA.....	6
Figura 3. Formación de los ovillos neurofibrilares.....	7
Figura 4. Representación esquemática del receptor tipo Toll.....	12
Figura 5. Alineamiento de gen <i>TLR4</i> y su proteína.....	13
Figura 6. Activación de la vía de receptor TLR4 a través de la vía MyD88-dependiente y MyD88-independiente.....	16
Figura 7. Gen <i>APOE</i> y sus proteínas correspondientes.....	18
Figura 8. Receptores de microglía involucrados en la cascada amiloide.....	22
Figura 9. Visualización de los ADN genómicos, Mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X.	34
Figura 10. Visualización de los productos amplificados correspondientes al alelo C de la variante rs4986791 del gen <i>TLR4</i> , mediante electroforesis de geles de agarosa al 1,5.....	35
Figura 11. Visualización de los productos amplificados correspondientes al alelo T de la variante rs4986791 del gen <i>TLR4</i> , mediante electroforesis de geles de agarosa al 1,5 %.....	36

INDICE

RESUMEN.....	iv
ABREVIACIONES.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	viii
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	22
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	52
BIBLIOGRAFIA.....	53

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una condición crónica neurodegenerativa asociada con una pérdida progresiva de las facultades cognitivas (Revisado en Downer, 2013). Alrededor de un 60 % al 70 % de los casos de demencia corresponden a la enfermedad de Alzheimer (Burns y Iliffe, 2009) y se estima que afecta al 10 % de las personas mayores de 65 años y al 25 % de las mayores de 80 años (Downer, 2013).

Los síntomas de esta patología fueron descritos por primera vez en 1906 por el neurólogo alemán Alois Alzheimer, en la paciente Auguste Deter (Revisado en Berchtold, 1998). Estos síntomas se han clasificados en tres grupos. El primer grupo, corresponde a la disfunción cognitiva e incluye pérdida de memoria, dificultades en el lenguaje y pérdidas de habilidades intelectuales y de planificación. El segundo grupo abarca síntomas psiquiátricos y perturbaciones del comportamiento, como depresión, alucinaciones y agitación. El tercer grupo corresponde a dificultades en la realización de las actividades diarias, desde actividades complejas, como ir de compras, hasta las más básicas, como vestirse o comer sin ayuda (Revisado en Burns y Iliffe, 2009).

A pesar de que hace ya más de un siglo que se describió la EA, ésta sigue siendo incurable e irreversible. Es más, el conocimiento que tenemos sobre ella sigue siendo conjetural, contradictorio y opaco. Sin embargo, se ha llegado a un consenso de que los factores desencadenantes de esta enfermedad son el péptido beta amiloide y la proteína tau, que van a formar las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, respectivamente, característico de la EA (Burns y Iliffe, 2009; Downer, 2013; Cras y col, 1991; Balistreri y col, 2009).

1. Cambios en el cerebro asociados con la Enfermedad de Alzheimer

Dos de los varios cambios cerebrales que contribuyen al desarrollo La Enfermedad de Alzheimer son:

1. La acumulación del péptido beta amiloide, formando las llamadas placas seniles o beta-amiloides, localizadas fuera de las neuronas y
2. La acumulación de una forma anormal de la proteína tau, formando los ovillos neurofibrilares, localizados dentro de las neuronas (Figura 1)

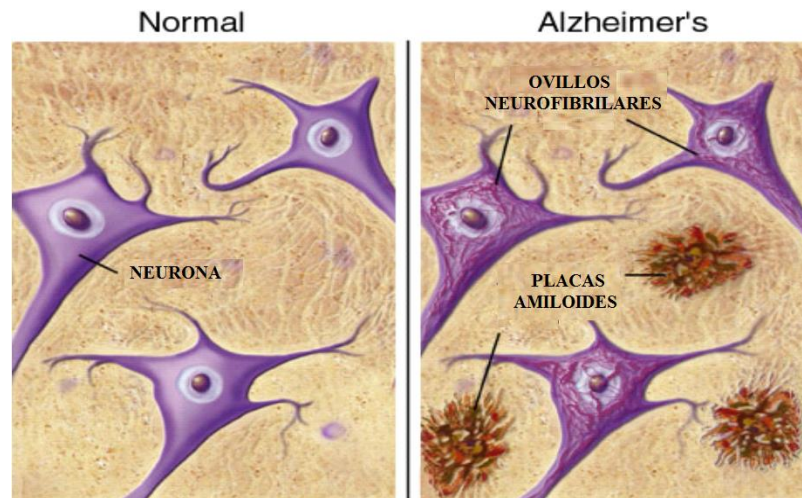


Figura 1. Representación esquemática de un cerebro humano normal y uno afectado por la EA. En el lado izquierdo se observa un cerebro normal. Del lado derecho se puede observar un cerebro afectado por la EA, donde se encuentran placas amiloides en los espacios intercelulares y los ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas. (Tomado de: Canedo y Moscoso, 2013).

En la EA, la transferencia de la información en las sinapsis comienzan a fallar, el número de sinapsis declina y las neuronas eventualmente mueren. Al parecer la acumulación del beta amiloide interfiere con la comunicación neurona-neurona en las sinapsis y contribuye a la muerte celular. Mientras que los ovillos neurofibrilares bloquean el transporte de nutrientes y otras moléculas esenciales en la neurona, contribuyendo también con la muerte celular. Los cerebros de personas con Alzheimer avanzado muestran una dramática disminución celular y una extensión de detritos de neuronas muertas (Alzheimer's Association, 2015)

2. Subtipos de enfermedad de Alzheimer

La EA puede clasificarse en función de la edad de inicio (aparición de los primeros síntomas) en temprano o tardío.

La EA de inicio temprano o familiar (EAOD, del inglés Early-Onset Sporadic Alzheimer's Disease) es rara (5 a 10% de los casos) y es causada por mutaciones que pueden ser heredadas de manera autosómica y dominante. (Balistreri y col, 2009).

La EA de tipo tardío o esporádico (LOAD, del inglés Late-Onset Sporadic Alzheimer's Disease), es el tipo más frecuente y su prevalencia va en aumento, dado el incremento de la población de la tercera edad. La forma esporádica de EA o de aparición tardía es de etiología multifactorial, ya que algunos polimorfismos y ciertos estilos de vida pueden proporcionar susceptibilidad. (Revisado en Minati y col, 2008)

2.1 Enfermedad de Alzheimer de aparición precoz

El término de EA de aparición precoz es usado para casos de EA diagnosticados antes de los 65 años. Aproximadamente, 13 % de los casos de EA de aparición precoz son del tipo familiar. Las personas con

esta enfermedad poseen una mutación autosómica dominante en uno (o en los dos) de los genes que codifican la presenilina-1 y presenilina-2 (*PSEN1* y *PSEN2*), localizados en el cromosoma 1 y 14, respectivamente, o en el gen de la proteína precursora del amiloide (*PPA*) localizado en el cromosoma 21. Pero, también se han asociado otros 8 genes (Revisado en Minati y col, 2008).

2.2 Enfermedad de Alzheimer de aparición tardía.

Esta forma de la enfermedad es la más frecuente. La mayoría de los casos de aparición tardía son del tipo esporádico. La causa de la forma esporádica no se conoce, ya que la enfermedad es heterogénea, causada por el envejecimiento en combinación con factores genéticos y ambientales. Sólo se conoce un factor de riesgo para la EA de inicio tardío, el alelo épsilon 4 ($\epsilon 4$) del gen de la apolipoproteína E (*APOE*), localizado en el cromosoma 19 (Minati y col, 2008). El World Alzheimer Report del 2014 asocia factores ambientales, como el alcohol, el tabaco, la obesidad, la dieta, la diabetes tipo II y la actividad mental con el desarrollo de esta patología.

3. Placas seniles o placas beta-amiloides

Las placas seniles son depósitos extracelulares del beta amiloide ($A\beta$), encontradas en el cerebro de los pacientes con EA y en ancianos sin la enfermedad (Cras y col, 1991). El $A\beta$ es un péptido de longitud variable (39-43 a:a), con un tamaño de 4-6 kDa y es producto del metabolismo de la proteína precursora del amiloide (PPA) (Revisado en Menéndez, Padrón & Llibre, 2002). Esta última es una glicoproteína transmembrana tipo I cuya principal función se desconoce, pero se asocia con la formación de la sinapsis entre neuronas.

El procesamiento de la proteína precursora del amiloide puede ocurrir por dos vías: la vía no amiloidegénica y la vía amiloidegénica (Figura 2). En la vía amiloidegénica, la PPA es escindida secuencialmente por las enzimas β y γ secretasa (Ehehalt y col, 2003). La beta-secretasa 1 (BACE1), conocida como enzima de escisión de la proteína precursora del péptido beta amiloide, escinde la PPA dentro del dominio extracelular/luminal, generando el extremo amino terminal del $A\beta$. Luego un complejo multimérico constituido por cuatro proteínas transmembranas y γ -secretasas son responsable de ejecutar el clivaje intra-membranal de la PPA, generando el fragmento carboxilo terminal, liberando el péptido $A\beta$ (Vetrivel y col, 2004). La longitud del péptido varía en su extremo C-terminal dependiendo de la manera en que haya sido escindida PPA; pudiéndose generar la isoforma $A\beta_{40}$, la más abundante, y el péptido $A\beta_{42}$, que es más hidrofóbico y, por ende, tiende a agregarse más rápido. El péptido $A\beta_{42}$ es capaz de inducir apoptosis, tanto en cultivos celulares de neuronas de hipocampo, como en ratones transgénicos que sobre-expresan PPA. Además, el péptido $A\beta$ puede estimular la liberación de citoquinas y quimioquinas por parte de células asociadas a las placas seniles (microglías y astrocitos), e inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés "Reactive Oxygen Species"), que pueden producir neurodegeneración y muerte neuronal (Micheli y col, 2003). Dentro de los agregados, el $A\beta$ adquiere una conformación del tipo hoja β que le permite polimerizarse en distintas estructuras, como oligómeros, fibrilar y protofibrilar (Revisado en Barage y Sonawane, 2015).

En la vía no amiloidegénica, la PPA es procesada a través de una segunda vía que no genera el péptido $A\beta$. Esta vía metabólica involucra la enzima α -secretasa, que escinde la PPA dentro del dominio de $A\beta$, provocando la formación de péptido $A\beta$ truncado que no está asociado con la enfermedad (Revisado en Dorey y col, 2014). Aunque se desconoce cómo se regula la vía en la que se va a

escindir la PPA, diferentes estudios indican que el polimorfismo del gen *APOE*, además, de otros factores como la dieta y el estado hormonal, pudieran estar involucrados (Krishnaswamy y col, 2009).

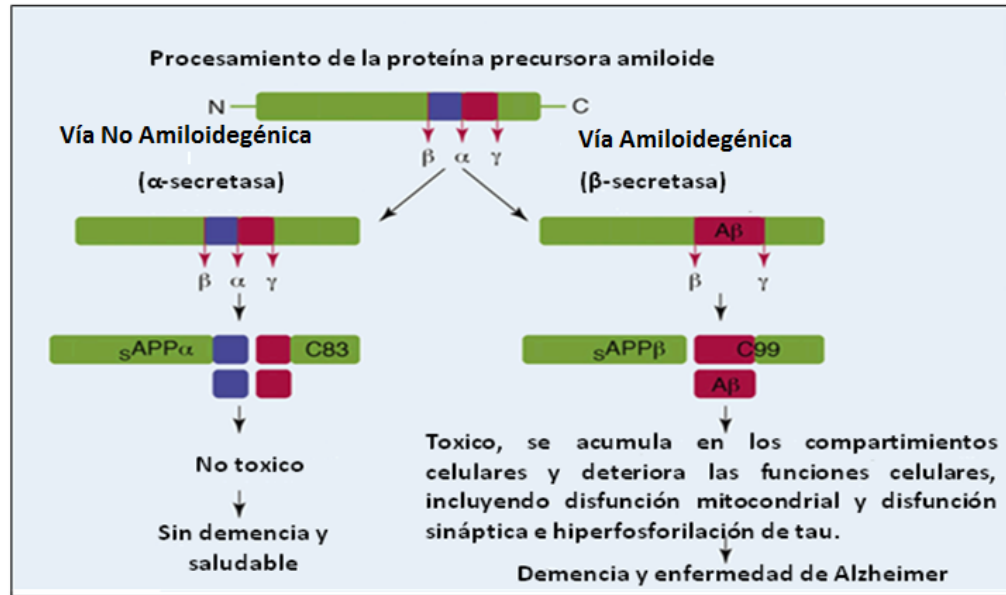


Figura 2. Procesamiento de la PPA en individuos sanos y pacientes con EA. El procesamiento de la PPA puede ocurrir por dos vías: la no amiloidegénica donde la α -secretasa corta dentro del dominio A β , generando un fragmento N-terminal soluble (sAPP- α) y un fragmento no amiloidegénico C-terminal de 83 aminoácidos (C83). En la vía amiloidegénica, el corte ocurre por la β -secretasa al comienzo del dominio del A β y genera un fragmento soluble N-terminal (sAPP- β) y un fragmento amiloidegénico C-terminal de 99 residuos (C99), que luego es escindido por la γ -secretasa y genera el péptido A β (Tomado de Reddy y Beal, 2008).

4. Ovillos neurofibrilares

La proteína tau se encuentra en abundancia en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP). Dicha proteína reside en los axones, y su función está relacionada con la unión de los microtúbulos, que se asocian a la tubulina para estabilizar el citoesqueleto neuronal (Revisado en Micheli y col, 2003). En la enfermedad de Alzheimer y en

otras taupatías, la proteína tau deja de estar asociada a los microtúbulos, agregándose posteriormente dentro de las neuronas para dar lugar a los ovillos neurofibrilares (Pérez, 2008). Estos ovillos se encuentran en el citoplasma neuronal y su número está directamente relacionado con la severidad de la demencia. Además, los ovillos se producen porque tau sufre una hiper-fosforilación irreversible que impide su función normal y a la vez facilita su auto-agregación en fibrillas (Menéndez, Padrón y Llibre, 2002) (Figura 3). Algunos autores señalan que el estrés oxidativo o moléculas relacionadas con el estrés oxidativo, como las quinonas, pudiesen jugar un papel en la agregación de la proteína (Micheli y col, 2003).

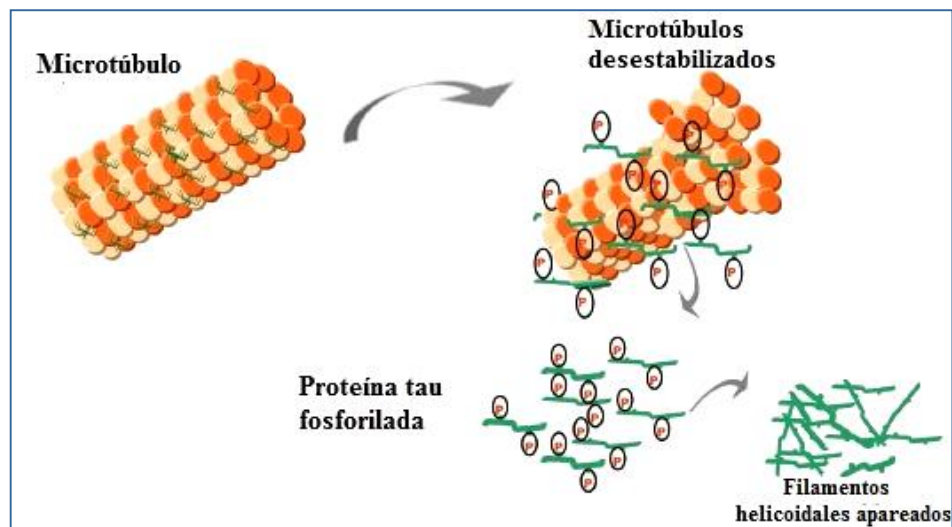


Figura 3. Formación de los ovillos neurofibrilares. En la EA hay una reducción en la capacidad de unión de los microtúbulos y de promover el ensamblaje de los microtúbulos. La proteína tau hiperfosforilada puede contribuir a una red de microtúbulos desestabilizado, alteración de transporte axonal y en última instancia en la formación de ovillos neurofibrilares y la muerte neuronal (Tomado de: de Paula V.J. y col, 2009)

5. Relación entre las placas seniles y ovillos neurofibrilares en la EA

No obstante, cuál es la relación entre las placas seniles y los ovillos neurofibrilares: ¿Uno será consecuencia del otro?, ¿Cuál puede ser el disparador de la enfermedad?

La hipótesis que más ha tomado fuerza es la de la cascada del amiloide. Esta supone que el factor disparador de la enfermedad es la sobreproducción, acumulación o pérdida de la función del péptido A β . A partir de ese enunciado se deduce que la hiperfosforilación de la proteína tau es consecuencia del estrés oxidativo provocado por la presencia de los agregados del A β . Evidencia que apoya esta hipótesis es que mutaciones en genes que codifican proteínas que componen el complejo γ -secretasas, como *PSEN1* y *PSEN2*, son responsables de la enfermedad de Alzheimer de aparición precoz (Revisado en Vetrivel y col, 2004). Las críticas a este modelo se fundamentaban en el hecho de que los depósitos de amiloide pueden estar distantes de las zonas con pérdida neuronal y que el mejor índice patológico de demencia es la pérdida de terminaciones sinápticas, correlacionándose con los ovillos neurofibrilares, pero pobremente con la placa de amiloide. Pero, recientemente se han descrito especies oligoméricas de A β , las cuales son neurotóxicas y están asociadas con deterioro cognitivo (Revisado en Dorey y col, 2012).

6. Neuroinflamación en la EA

Hay cierto consenso en la idea de que la neuroinflamación juega un papel importante en la EA. La inflamación es una respuesta del organismo a una infección, herida o trauma. Dentro del cerebro esta respuesta es llevada a cabo por células residentes o inducida por

células del sistema inmunitario ubicadas en la periferia, que se infiltran en el cerebro (Harry y Kraft, 2008). Los efectos de esta respuesta incluyen la remoción de restos celulares, la secreción de factores neurotróficos, citocinas y la activación de proteasas. La neuroinflamación es disparada por las microglías. Éstas son células mieloides residentes del SNC, siendo las principales células de la inmunidad innata en el SNC de origen embrionario-hematopoyético. Como casi todos los macrófagos tisulares, las microglías escanean el cerebro en búsqueda de patógenos y, además, regulan la homeostasis del SNC y están involucrados en la plasticidad neuronal (Heppner y col, 2015).

Las microglías están equipadas para detectar señales de peligro, tales como agregados de proteínas en la EA, y para responder a peligros en la salud neuronal mediante la adopción de cambios morfológicos y de atributos funcionales; en otras palabras, dichas células se “activan” para iniciar una respuesta. Estas células se denominan "reactivas"(Heppner y col, 2015).

Las microglías, en el contexto de la EA, están involucradas en la limpieza de los depósitos del A β , en la iniciación de la fagocitosis y la liberación de mediadores citotóxicos (Doens y Fernández, 2014). Para cumplir con estas funciones, las microglías utilizan una serie de receptores que reconocen motivos característicos comunes en ciertos patógenos, llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés Pattern Recognition Receptors) o bien moléculas asociadas a daño celular, conocidos como patrones moleculares asociados a daño celular propio y no propio (DAMPs, por sus siglas en inglés Damage-associated molecular pattern molecules). Un grupo específico de esos receptores son los receptores Tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés Toll like receptors). Por tanto, los TLRs

juegan un papel clave en la respuesta inmunitaria innata en la EA, siendo esta hipótesis apoyada por muchos autores (Yu y col, 2012; Boutajangout y Wisniewski, 2013; Doens y Fernández, 2014; Landreth & Reed-Geaghan, 2009; Michaud y col, 2012; Downer, 2013).

Dentro de la familia de los TLRs, específicamente el TLR4 está involucrado en el reconocimiento de depósitos de amiloide (Waltery col, 2007 y Tahara y col 2006) y la subsecuente producción de citoquinas pro-inflamatorias. La respuesta inflamatoria iniciada por la microglía, en muchos casos es beneficiosa y necesaria, eliminando los depósitos de A β . Sin embargo, si se prolonga demasiado tiempo, ya sea debido a la sobreproducción de A β o a la ineficacia de los mecanismos de limpieza, puede provocar toxicidad, ya que este proceso involucra la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas y ROS, que en exceso ocasionan una respuesta inmunitaria descontrolada que contribuye con la neurodegeneración (Minter y col, 2015). Igualmente, esta respuesta inflamatoria provoca la hiperfosforilación de la proteína tau y la producción de A β 43, que a su vez estimula la inflamación, provocando así un círculo vicioso (Heppner y col, 2015).

Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estos eventos no han sido develados. Por lo tanto, los estudios se enfocan en determinar los probables mecanismos que expliquen los mismos. Entre ellos el TLR4, receptor responsable del reconocimiento de los depósitos de amiloide por parte de las microglías, pudiese tener un papel clave en la EA (Yu y col, 2012; Boutajangout y Wisniewski, 2013; Doens y Fernández, 2014; Landreth y Reed-Geaghan, 2009; Michaud y col, 2012; Downer, 2013).

7. Receptores tipo Toll (TLR)

Los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) son aquellos que detectan estructuras comunes entre diversos agentes infecciosos. Entre estos se encuentran la familia de receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo RIG-I (RLR), receptores tipo NOD (NLR) y receptores citosólicos de DNA, los cuales participan en la respuesta inmunitaria innata reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por su siglas en inglés Pathogen-Associated Microbial patterns), como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y/o lípidos de diversos microorganismos (Osamu & Shizuo, 2009; Carty & Bowie, 2010). Los receptores toll, fueron descubiertos por primera vez en la mosca *Drosophila* spp y, posteriormente, en humanos se encontraron dominios parecidos a estos, por lo que se denominaron receptores tipo Toll (Osamu & Shizuo, 2009)

Los receptores Toll son moléculas transmembrana que presentan tres regiones estructurales, el extremo amino que contiene la región extracelular y el dominio de unión al ligando, caracterizado por la presencia de motivos repetidos, donde cada motivo tiene 24 aminoácidos, y son denominados repeticiones ricas en leucina (LRR, por sus siglas en inglés Leucine-Rich Repeat) (Gay y col., 2006). La siguiente región, la transmembrana, está formada por una única α -hélice rica en aminoácidos de glicina y alanina. Finalmente, se encuentra el extremo carboxilo-terminal ubicado en la región intracelular que contiene un dominio citoplasmático globular denominado TIR (receptor Toll/IL-1), que originalmente se identificó como parte del receptor de IL-1 (Domínguez y col., 2009) (Figura 4). Estos dominios TIR, son los encargados de formar un andamiaje de proteínas citoplasmáticas involucradas en la transducción de la señal, que finalmente desencadenan los efectos fisiológicos de la respuesta celular.

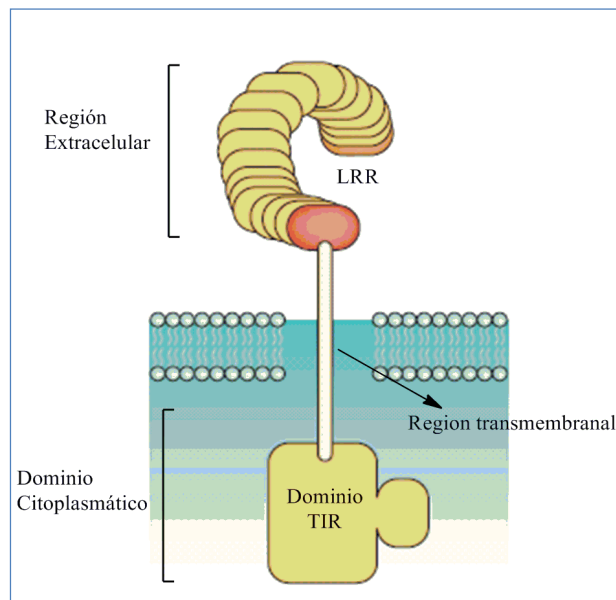


Figura 4. Representación esquemática del receptor tipo Toll. Se destacan las tres regiones/dominios básicos: la región extracelular, rica en leucina, la región transmembrana y el dominio intracelular tipo TIR (dominio de IL-1) (Tomado de Gay y col., 2006).

Se han descrito 13 tipos de receptores TLR, de los cuales solo 10 miembros se encuentran en humanos. Los TLRs pueden ser separados en dos categorías basados en su localización celular. Los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, y TLR6 son expresados en la superficie celular para el reconocimiento de ligandos extracelulares, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 están localizados en el compartimento endosomal para el reconocimiento de motivos de ácidos nucleicos de patógenos (Hanke & Kielian, 2011).

7.1. TLR4

El TLR4 representa el primer miembro de la familia de los TLRs identificado en humanos. El ligando típico de este receptor es la molécula de lipopolisacárido (LPS), propia de las bacterias Gram-

negativas. Además, es capaz de interactuar, directa o indirectamente, con ligandos endógenos, como proteínas de choques térmico (HSP, por sus siglas en inglés Heat-Shock Protein), ácido hialurónico, β -defensina-2, fibronectina y péptido A β (Lu, Yeh y Ohashi, 2008). Sobre este último punto, varios autores han descrito el papel que cumple TLR4 en el reconocimiento de depósitos de A β , con la ayuda de MD2 y CD14 (Gaikwad y col, 2015; Walter y col, 2006; Tahara y col 2007), y por tanto, en la activación de las microglías.

El gen *TLR4* está localizado en el cromosoma 9q32-33. Posee 3 exones y 2 intrones (Figura 5). En el tercer exón se han hallado dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) no sinónimos, Asp299Gly (+896 A/G; rs4986790) y Thr399Ile (+1196 C/T; rs4986791), que pueden ser cosegregados. Se ha demostrado que estos polimorfismos influyen en el riesgo a varios desórdenes multifactoriales asociados con la edad, debido a que los TLR4 con estos polimorfismos tienen menor afinidad por sus ligandos (Yu y col, 2012). Estos polimorfismos se encuentran con una frecuencia mayor al 5 % en distintas poblaciones (Canadienses caucásicos 10%, Americanos caucásicos 10%, Alemanes 5,6% y Belgas 8%) (Revisado en Chrzęszczuk, Konopka y Ziętek, 2015).

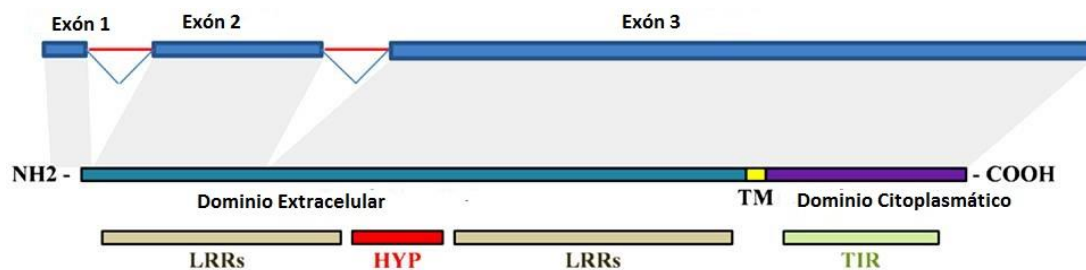


Figura 5. Alineamiento de gen *TLR4* y su proteína. El exón 1 codifica el péptido señal para la migración y el aminoácido inicial del dominio extracelular. El exón 2 codifica el primer motivo de repeticiones ricas en leucina (LLR) en el dominio extracelular. El exón 3 codifica el resto del dominio

extracelular (la región hipervariable (HYP) y los otros LRR), el dominio transmembrana (TM) y el citoplasmático (Tomado de Vaure & Liu, 2014).

7.2 Activación de TLR4

El TLR4 para reconocer a su ligando, el LPS, su región extracelular usa una proteína accesoria llamada proteína de diferenciación mieloide 2 (MD2). Cuando el complejo TLR4-MD2 encuentra una molécula de LPS, cinco cadenas lipídicas de LPS se unen a un bolsillo hidrofóbico de MD2, pero no directamente a TLR4, mientras una sexta cadena lipídica queda expuesta en la superficie de MD2. Esta cadena, junta parte del eje central de polisacáridos del LPS, se une a la superficie convexa del dominio extracelular de una segunda molécula de TLR4. Por lo tanto, la dimerización de TLR4 requerida para la activación de las rutas de señalización intracelulares depende de una interacción directa e indirecta con LPS (Murphy, 2012).

Además, en la activación de TLR4 se ven involucradas otras dos moléculas: la proteína de unión de LPS, que une a la moléculas de LPS que se encuentran solubilizadas en la sangre y el fluido extracelular; y la molécula CD14, que promueve el reconocimiento de algunas ligandos (Zanoni, 2012).

La activación de TLR4 puede inducir diferentes respuestas intracelulares que resultan en la producción de citoquinas inflamatorias, factores quimiotácticos e interferones Tipo I (IFN- α e IFN- β) (Murphy, 2012). El funcionamiento de estas rutas de producción puede ser dependiente o independiente de la proteína acopladora MyD88. La vía MyD88-dependiente es responsable de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, mientras que la vía MyD88-independiente media la expresión de interferones Tipo I (Revisado en Lu, Yeh & Ohashi, 2008).

En la vía dependiente de MyD88, esta proteína acopladora es reclutada y asociada con los TLR4 dimerizados a través de los dominios TIR de ambas moléculas. TIRAP facilita la asociación entre MyD88 y el dominio TIR (Revisado en Lu, Yeh & Ohashi, 2008). Esto permite que MyD88 se una a la cinasa IRAK-4 e IRAK-1, la proximidad entre ambas cinasas provoca que IRAK-4 fosforile a IRAK-1. IRAK-1 fosforilada se une a la proteína TRAF-6, ambos se disocian del complejo del receptor e interactúan con otro grupo proteico formado por TAK1, TAB1 y TAB2. Luego surgen dos vías independientes de señalización: una que provoca la activación de las MAPK cinasas y otra que conduce a la activación del sistema NF- κ B. En la primera ruta, la activación de TAK1 induce la fosforilación de las MAPK's cinasas (ERK, JNK y p38), promoviendo la migración al núcleo del factor AP1. En la segunda ruta, TAK 1 fosforila el complejo de cinasas de I κ B (IKKs) que a su vez fosforilan a la proteína inhibidora I κ B marcándola para su destrucción. Esto provoca que el dímero NF- κ B migre al núcleo ya que la secuencia de localización nuclear queda expuesta. Ya en el núcleo, el factor transcripcional se une a sus elementos de respuesta en los promotores de sus genes blanco (Figura 6) (Revisado en Nieto, Dehesa & Rodríguez, 2009; Murphy, 2012).

La señalización de la vía independiente a MyD88 abarca la siguiente secuencia: la proteína acopladora TRIF, ayudada por la proteína acopladora TRAM, recluta al complejo proteico TRAF6-TAK1-TAB2 que activa a las IKKs, permitiendo la liberación de NF- κ B, además, de la probable activación del complejo MAPK. A través de otra ruta, la molécula TRIF interactúa con el dímero TBK1/IKK ϵ , ocasionando la migración del factor nuclear IRF- 3 (Factor regulador de IFN-3), provocando la síntesis de interferón tipo I (IFN α/β) (Revisado en Nieto, Dehesa & Rodríguez, 2009).

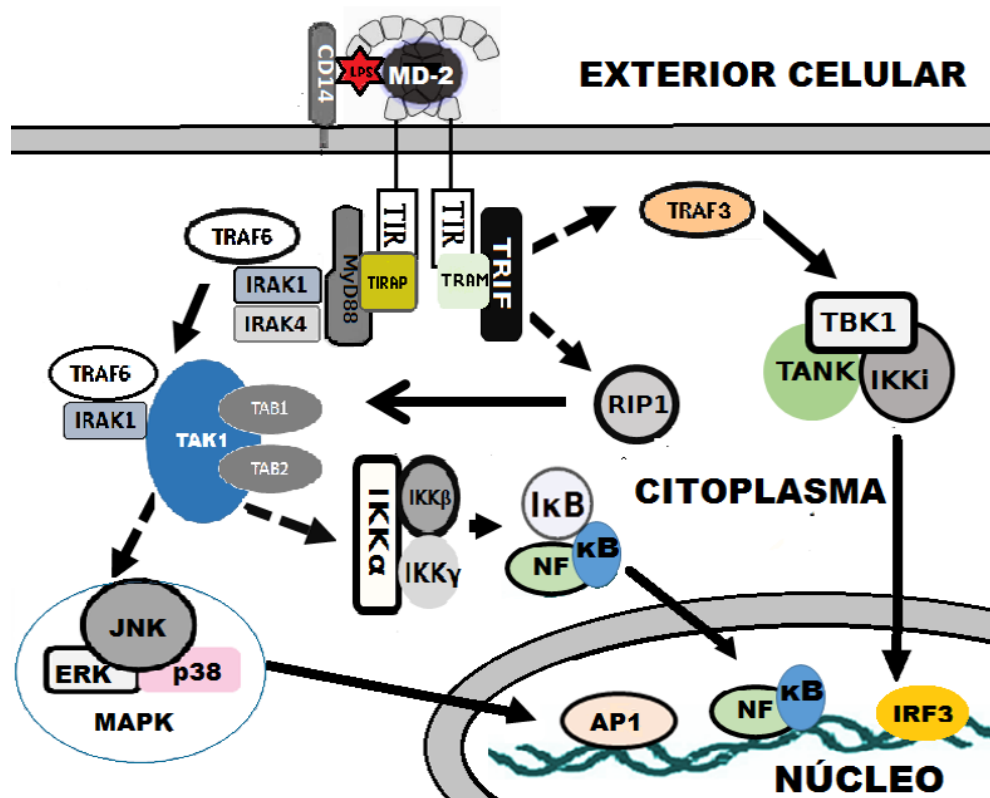


Figura 6. Activación de la vía de receptor TLR4 a través de la vía MyD88-dependiente y MyD88-independiente. MyD88 posee un dominio que se une al dominio TIR en el receptor TLR4 activado, con ayuda de TIRAP. Al unirse al TLR, MyD88 recluta cinasas de la familia IRAK. Las proteínas IRAK interactúan con TRAF-6, permitiendo que TRAF-6 active al complejo TAK1-TAB1-TAB2. TAK1 fosforila el complejo IKK, activándolo. El complejo IKK activado destruye el inhibidor de NF-κB (IκB) dejando NF-κB libre, el cual puede migrar al núcleo. TAK1 también puede activar a las cinasas MAP que promueven la migración de AP1 al núcleo. La vía MyD88-independiente involucra el adaptador TRIF que, ayudado por TRAM, recluta el complejo TRAF6- TAK1- TAB2 que fosforila a las IKKs y MAPKs. TRIF también activa IRF-3, a través de una vía TBK1/IKKε dependiente. (Nieto, Dehesa & Rodríguez, 2009) Figura realizada por Br. Ricardo Romero.

8. Apolipoproteína E en la EA

Hasta la fecha, el principal factor de riesgo para EA es la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen codificante de la apolipoproteína E (*APOE*) (Revisado en: Saul y Wirths, 2016; Dorey y col, 2014; Ehehalt y col, 2003). *APOE* es una lipoproteína de 229 a:a que es expresada en muchos órganos, pero su mayor expresión se da en el hígado, seguido por el cerebro. En el cerebro, *APOE* es producida principalmente por astrocitos y, en menor medida, por microglías. En ciertas ocasiones también es expresada por neuronas. *APOE* es una de las lipoproteínas claves en el complejo de lipoproteínas que regulan el metabolismo de lípidos dirigiendo el transporte, el envío y distribución de éstos desde un tejido o tipo celular a otro a través de receptores de *APOE* (Revisado en Alonso, López, Yesca, 2012).

El gen *APOE* está localizado en el cromosoma 19q13.2, está formado por cuatro exones y tres intrones, y tiene una extensión de 3.597 nucleótidos (Figura 7).

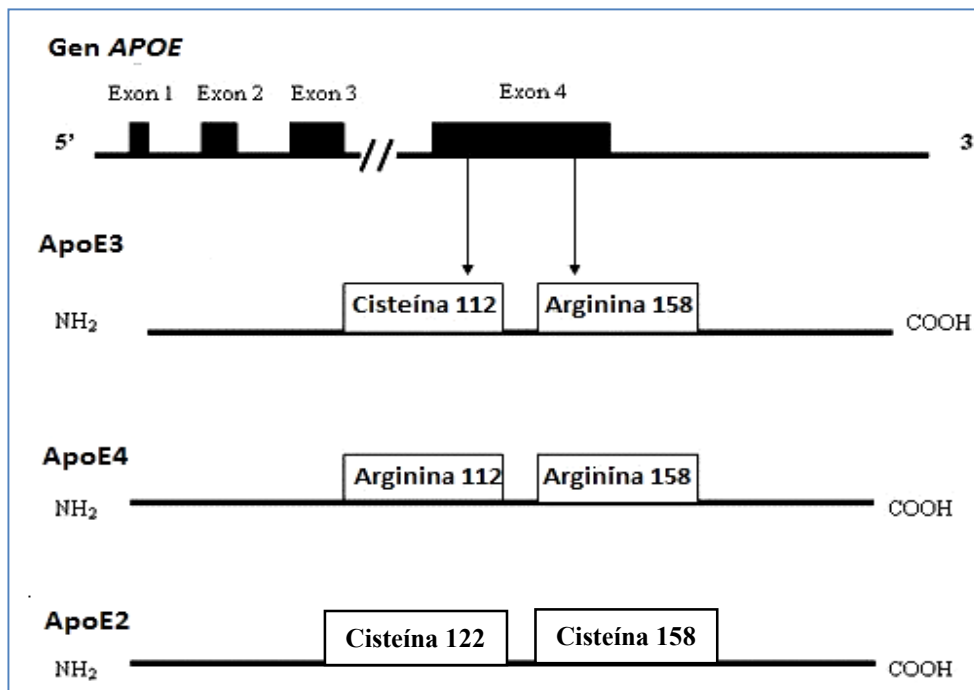


Figura 7. Gen *APOE* y sus proteínas correspondientes. La figura muestra al gen con sus cuatro exones, representados por las barras negras. Dentro del cuarto exón, están los codones con los polimorfismos que generan los cambios de aminoácidos en las posiciones 112 y 158 de la proteína ApoE, lo cual resulta en las tres proteínas correspondientes, ApoE3, ApoE4 y ApoE2. (Tomado de Berglund, 2005)

Los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP): rs429358 (T/C) y rs7412 (C/T) determinan los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ del gen *APOE*, los cuales codifican tres isoformas diferentes de la proteína ApoE. Estas tres variantes determinan seis genotipos: $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$ (Revisado en Carrasquillo y col, 2013) (Tabla I)

Tabla I. Composición de los alelos y Genotipos APOE. Se indica el cambio de base nucleotídica (ADN) y el cambio de aminoácido (posiciones 112 y 158) en la proteína ApoE

Alelo APOE	rs429358 (T/C)	a:a 112	rs7412 (C/T)	a:a 158
$\epsilon 2$	TGC	Cisteína	T GC	Cisteína
$\epsilon 3$	TGC	Cisteína	CGC	Arginina
$\epsilon 4$	C GC	Arginina	CGC	Arginina

Alelo APOE	rs429358 (T/C)	rs7412 (C/T)
$\epsilon 2/ \epsilon 2$	T/T	T/ T
$\epsilon 2/ \epsilon 3$	T/T	T/ C
$\epsilon 2/ \epsilon 4$	T/ C	T/C
$\epsilon 3/ \epsilon 3$	T/T	C/C
$\epsilon 3/ \epsilon 4$	T/ C	C/C
$\epsilon 4/ \epsilon 4$	C/C	C/C

De los tres alelos más comunes del gen *APOE*, el alelo $\epsilon 3$ es el más frecuente (77% de la población) y el alelo $\epsilon 2$ el menos frecuente (8%), el cual está asociado con cierto grado de neuroprotección contra EA. (Sabbag y col, 2006). Comparados con individuos de genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$, los individuos heterocigotos $\epsilon 3/\epsilon 4$ tienen tres veces mayores posibilidad de padecer EA y los Individuos homocigotos para $\epsilon 4$ el riesgo es 12 veces mayor (Roses, 1996). A pesar de la fuerte asociación genética del alelo $\epsilon 4$ con el desarrollo de EA, no es necesario ni

suficiente para el desarrollo de esta patología (Patterson y col, 2008), por lo tanto, no puede ser usado por sí solo para diagnosticar LOAD.

El papel del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* en la EA es aún t3pico de discusi3n. Algunos autores se3alan que un aumento en la cantidad de colesterol presente en el cerebro, causado por este alelo o por la dieta, provoca cambios en la composici3n de l3pidos en la membrana celular y en las balsas lip3dicas de las neuronas (Cordy, Hopper y Turner, 2006). Distintos estudios han correlacionado el aumento del n3mero de balsas lip3dicas con el incremento de la actividad de BACE1, y por lo tanto, con una mayor producci3n del p3ptido A β (Ehehalt y col, 2003; Cordy, Hopper y Turner, 2006). Es decir, a mayor cantidad de colesterol se ve favorecida la degradaci3n de PPA por la v3a amiloideg3nica (β y γ secretasa) y a menor cantidad de colesterol se ve favorecida la v3a no amiloideg3nica (α -secretasa). Sin embargo, otros estudios no han encontrado evidencia de un efecto isoforma espec3fico de ApoE en el procesamiento de PPA (Revisado en Kim, Basak y Holtzman, 2011), y otros sugieren que la ApoE pudiera estar involucrado en la eliminaci3n del p3ptido A β , siendo el alelo $\epsilon 4$ menos eficiente en esta tarea (Morrow y col, 2002).

En los 3ltimos a3os la hip3tesis que ha tomado m3s fuerza es la de que ApoE pudiera estar involucrado en una respuesta anti-inflamatoria provocada por el p3ptido A β (Dorey y col, 2014). Consistente con esto es el hecho de que la supresi3n de la expresi3n de ApoE, en ratones est3 asociada con un incremento en la inflamaci3n, incluyendo la inducci3n de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a estimulaci3n con A β . Sin embargo, se piensa que esta respuesta es dependiente de la isoforma de ApoE, lo que explicaría las diferencias en el riesgo a LOAD conferido por cada una. Teniendo ApoE4 un efecto pro-inflamatorio, o menos anti-infamatorio, que exacerba la

neuroinflamación en EA, en comparación con ApoE3 (Revisado en Kim, Basak y Holtzman, 2011). Finalmente, se ha descrito una relación entre la activación del sistema de complemento y ApoE4 con enfermedades asociadas al amiloide y tau (Bonham, Desikan, Yokoyama, 2016). Por lo tanto, no se sabe aún con exactitud si el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* favorece el desarrollo de LOAD por pérdida de funciones protectoras, por la adquisición de funciones tóxicas, o una combinación de ambas.

ANTECEDENTES

Los mecanismos a través del cual los depósitos amiloides provocan inflamación no están completamente elucidados. Las microglías expresan varios receptores que cooperan en el reconocimiento, internalización y limpieza de $A\beta$ y en la activación celular. Receptores de microglía, tales como receptores scavenger (SR-AI/II), CD36, receptor de productos avanzados de glicosilación terminal (RAGE, por sus siglas en inglés Receptor for Advanced Glycosylation End Products), receptores Fc, receptores toll (TLRs) y receptores de complemento están involucrados en esos procesos (Revisado en Doens & Fernández, 2014)

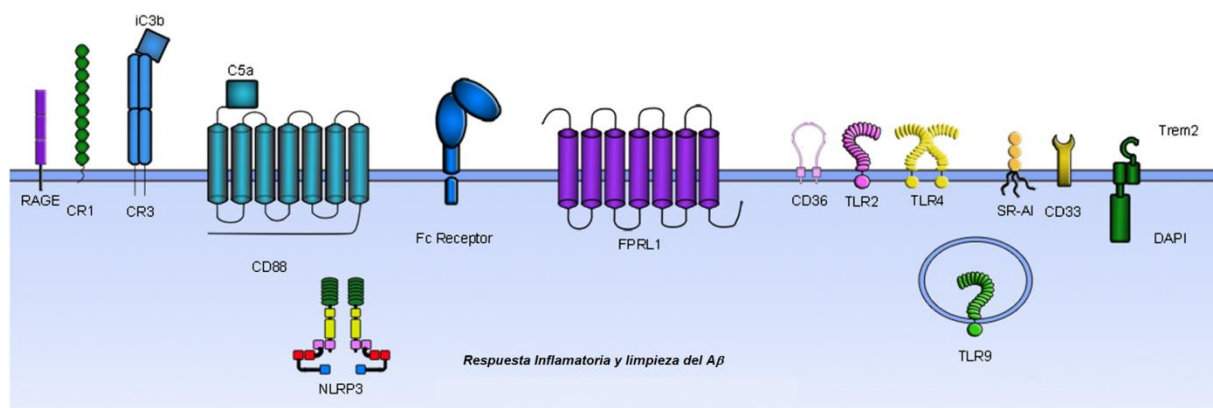


Figura 8. Receptores de microglía involucrados en la cascada amiloide.

Una variedad de receptores están involucrados en la limpieza del $A\beta$ y disparar la respuesta inflamatoria. Algunos receptores (RAGE, NLRP3) están implicados principalmente en la generación de una respuesta inflamatoria por disparar una cascada de señalización que resulta en la producción de mediadores pro-inflamatorios. Otros receptores (SR-AI, TREM2) están involucrados en la limpieza del $A\beta$ al inducir la internalización de fibrillas de $A\beta$. Algunos receptores (receptores de complemento, receptores Fc, FPRL1/FPR2, CD36, TLRs) están involucrados en ambos procesos. CD33 al parecer promueve la acumulación del $A\beta$. (Tomado de: Doens & Fernández, 2014)

Las microglías expresan los TLRs 1 a 9, y muchos de esos receptores han sido asociados con la activación de la microglía y neurotoxicidad, tanto en ratones como en seres humanos. En ratones transgénicos APP23 se ha descrito altos niveles de ARN mensajero de TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR9 en tejido cerebral asociado a placas. Los TLRs han sido implicados en la señalización A β , disparando una cascada intracelular, resultando en la producción de moléculas pro-inflamatorias y la toma y limpieza del A β . El TLR4, además, de reconocer lipopolisacáridos, es capaz de reconocer otras moléculas endógenas y exógenas, (Revisado en Doens & Fernández, 2014).

En el 2007, Walter y colaboradores, publicaron un estudio en el cual mostraban la primera evidencia del papel protagónico de TLR4 en la neuroinflamación observada en la EA. Ellos describieron que la activación de la microglía, inducida por el péptido A β , ocurría vía TLR4. Esta activación dependía de la integridad del complejo conformado por TLR4, MD2 y CD14 (Walter y col, 2007). Además, la activación de las microglías, mediada por TLR4 e inducida por A β , ha sido implicada en la neurotoxicidad, basado en observaciones de una disminución en la muerte de cultivos celulares de neuronas del hipocampo después del contacto con sobrenadantes de microglías activadas con A β de ratones con TLR4 mutados (Revisado en Doens y Fernández, 2014).

En el 2006, Tahara y colaboradores, demostraron que las microglías estimuladas con ligandos para TLR4, tales como LPS, incrementaban la toma de A β *in vitro*. Además, observaron en ratones con una respuesta deficiente a LPS (Tlr4^{Lps-d}) un incremento en la carga

del A β e *in vitro* una disminución en la toma de A β por la microglía. Demostrando el papel preponderante de los TLR en la activación de las microglías encargadas de limpiar los depósitos del A β (Tahara y col, 2006).

En el 2008, Jing-Ji Jin y colaboradores, demostraron en ratones transgénicos que sobre-expresaban PPA, que el TLR4 jugaba un papel clave en la regulación de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Jin y col, 2008).

Michaud y colaboradores sugirieron que el monofosforil lípido A (MPL), un agonista de TLR4 con menor toxicidad que LPS, actuaba como un disparador de la limpieza del A β . Asimismo, MPL inducía una respuesta inflamatoria suave en la microglía, mientras incrementaba la habilidad de esas células para internalizar el péptido A β (Michaud y col, 2013).

El año 2013 Ziakas y colaboradores realizaron un meta-análisis donde revisaron 59 estudios enfocados en el polimorfismo *TLR4* 1196C> T en diversas enfermedades. Hallaron que esta variante estaba asociada a diversas enfermedades como malaria, lupus, leishmaniosis, entre otras.

Otros estudios han investigado la asociación entre el polimorfismo del gen *TLR4* y susceptibilidad a la EA.

Minoretti y colaboradores estudiaron la frecuencia del polimorfismo Asp299Gly del gen *TLR4* en la población de Italia. Analizaron un total de 277 pacientes con EA y 300 controles, observando que la frecuencia del polimorfismo Asp299Gly estaba incrementada en los controles, sugiriendo que este alelo proporcionaba protección contra la EA de inicio tardío (Minoretti y col, 2006).

En el 2012, Yen-Ching Chen y colaboradores, estudiaron variantes del gen *TLR4* en una población de Taiwán. Determinaron que la variante *rs1927907* de *TLR4* estaba asociada con un riesgo

incrementado a desarrollar EA de inicio tardío, especialmente en pacientes que no portaban el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* (Chen y col, 2012). Para ese mismo año, Yu y colaboradores hicieron un estudio caso-control donde analizaron 10 polimorfismos presentes en el gen *TLR4*, con la finalidad de buscar una asociación de este gen con la EA de inicio tardío. Además, asociaron estos polimorfismos con variables, como la presión arterial, el sexo, la masa muscular y perfil lipídico. En este estudio, observaron que los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile estaban ausente en la población, pero encontraron que la variante rs7045953, localizado en el la región 3' no traducida del gen *TLR4*, estaba asociada a la EA de inicio tardío, sugiriendo que el gen *TLR4* contribuye con la susceptibilidad a desarrollar la EA de inicio tardío en esa población (Yu y col, 2012).

Todos esos resultados sugieren diferentes papeles de la señalización TLR4, que al parecer están asociados con procesos beneficiosos (limpieza del A β) y perjudiciales (neurotoxicidad). Por lo tanto, diferentes modelos terapéuticos en la EA pueden ser dirigidos para revertir las funciones perjudiciales del TLR4. Bloqueando la señalización TLR4 se inhibiría la activación de la microglía, reduciendo así la producción de citoquinas, pero desmejoraría la toma del A β e incrementaría su deposición. Por otra parte, la inducción de la señalización de TLR4 a través de la activación igual a MPL pudiese incrementar la toma del A β con una producción disminuida de citoquinas pro-inflamatorias (Doens y Fernández, 2014).

Con respecto al gen *APOE*, en 1993 Strittmatters y colaboradores hallaron una mayor frecuencia del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* en pacientes con EA escogidos de manera aleatoria en comparación con controles (Strittmatters y col, 1993), asociación que fue confirmada en una gran cantidad de estudios (Poirier y col, 1993; Tang y col, 1998;

Meyer y col, 1998; De Mendonça y col, 2014, Bonham y col, 2016; Saul y Wirths, 2016,).

Fundamentados en que la asociación del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* con el desarrollo de la EA de aparición tardía es una de las más fuertes, y que diferentes estudios han propuesto que el receptor TLR4 participa en la patología de esta enfermedad, nos planteamos los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el polimorfismo *rs4986791* del gen *TLR4* y su correlación con los polimorfismos *rs429358* y *rs7412* del gen *APOE* en pacientes con Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

Objetivos específicos:

- Determinar la distribución del polimorfismo *rs4986791* del gen *TLR4* en individuos venezolanos sanos y con Enfermedad de Alzheimer.
- Establecer posibles asociaciones entre el polimorfismo *rs4986791* del gen *TLR4* y el riesgo a padecer EA.
- Correlacionar los genotipos del polimorfismo *rs4986791* del gen *TLR4* con los genotipos (*rs429358* y *rs7412*) del gen *APOE* y el riesgo a padecer EA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de pacientes con EA

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

Dicho protocolo se estructuró de acuerdo a los siguientes parámetros:

- a) Los criterios de la Sociedad Psiquiátrica Americana (DSM-IV), del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos, de la Comunicación y de Accidentes Vasculares Cerebrales (NINCDS) y los criterios de la Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Conexos (ADRDA).
- b) Evaluación médica geriátrica, la cual consistió en la historia clínica general y la aplicación de la escala de Deterioro Global de Resberg (GDR) y del Test de Demencia Clínica (CDR).
- c) Evaluación médica neurológica según protocolo clínico específico, documentada con el miniexamen mental de Folstein, la escala isquémica de Hachinski y los instrumentos de evaluación diagnóstica para demencia vascular (ADDTC, MINDA-ADRA).
- d) Evaluación psicológica, realizada mediante entrevistas dirigidas a pacientes y familiares, así como también la

aplicación de baterías de pruebas neuropsicológicas y el Alzheimer's Disease Assessment Scale (ADAS).

- e) Estudios imagenológicos correspondientes a la evaluación estructural por neuroimagen mediante las pruebas de tomografía axial computarizada (TAC) y/o resonancia magnética (RM).
- f) Estudios de laboratorio: hematología completa química sanguínea, electrolitos, hormonas tiroideas (T3, T4, TSH), VDRL y VIH, niveles de B12.
- g) Electroencefalograma de manera opcional.

2. Selección del grupo control

El grupo control estuvo conformado por 102 individuos sanos, venezolanos, con un promedio de edad de 71 ± 10 años. A este grupo se le realizó el miniexamen mental de Folstein, las pruebas de laboratorio e imagenológicas.

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

3. Determinación del polimorfismo del gen *APOE*

Los pacientes y controles incluidos en el estudio fueron previamente tipificados para las tres variantes comunes del gen *APOE* ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$), definidas por los SNPs *rs429358* y *rs7412*. Esta determinación fue realizada por el personal del laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental del IVIC.

4. Extracción del ADN genómico

El ADN genómico fue extraído por el EG. de doctorado N. Cedeño,

quien utilizó los siguientes métodos: el método con solvente orgánico (Bunce M.) y la utilización del Qiagen Kit (QIAamp DNA Mini Kit).

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

a) Extracción de ADN por el Método de Bunce (Bunce, 2000)

La muestra de sangre periférica se centrifuga por 10 min a 1000g para obtener los leucocitos (capa blanca), los cuales son lavados con 10 mL de buffer de lisis de células rojas (RCLB, red cell lysing buffer), se agita por inversión. Luego se centrifuga a 1000g por 10 min, se descarta el sobrenadante y se repite el lavado con RCLB hasta que el precipitado de leucocitos quede blanco.

El precipitado se resuspende en 3 mL de tampón de lisis nuclear (NLB, nuclear lysis buffer) y se deja en baño a 56°C hasta que se disuelva el precipitado. Luego se añade 1 mL de cloruro de sodio (NaCl 5,25 M), se agita por vórtex, se añaden 2 mL de cloroformo, se vuelve agitar hasta formar una solución lechosa, se centrifuga por 20 min a 1000g; posteriormente se aspira el ADN (fase orgánica) y se transfiere a un tubo de polipropileno.

A la fase acuosa se le añade 2 volúmenes de etanol 95% frío, se rota el tubo hasta que precipite el ADN, se atrapa la malla con una pipeta de transferencia de polipropileno y se pasa a un tubo de 1,5 mL estéril. El ADN se resuspende en etanol 70% y se centrifuga por 5 min máxima velocidad, se voltea el tubo sobre una servilleta para eliminar el exceso de etanol. Finalmente se resuspende el ADN en tampón TE 1X.

b) Extracción de ADN por el estuche Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit) de laboratorios Roche:

En primer lugar se extrae la capa de células blancas, se transfieren 20 µL de la solución stock de proteasas a un tubo de 1,5 mL

que contiene 200 µL de muestra, se añaden 200 µL de tampón AL, se mezcla 15 segundos en vórtex. Se incuba a 56°C por 10 min y se añaden 200 µL de etanol 96%, se mezcla por vórtex 15 segundos y se centrifuga para bajar las gotas. Se pasa la mezcla anterior por una columna de QIAamp sin mojar los bordes, se tapa bien y se centrifuga a 6000g por 1 min, se coloca la columna en un tubo colector de 2 mL nuevo, se abre cuidadosamente la columna y se añaden 500 µL de tampón Aw1 sin mojar los bordes, se centrifuga a 6000g por 1 min, posteriormente se coloca la columna en un tubo colector de 2 mL y se descarta el que posee el filtrado.

Se abre la columna y se añaden 500 µL de tampón Aw2 sin mojar los bordes, se tapa bien y se centrifuga a máxima velocidad por 4 min. Se coloca la columna en un tubo de 1.5 mL nuevo y se añaden 200 µL de tampón AE, se incuba a temperatura ambiente por 15 min, se centrifuga a 6000g por 1 min.

5. Ajuste de la concentración de ADN

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

La concentración del ADN (µg/mL) viene dada por la fórmula:

$$[\text{ADN}] = 50 \text{ µg /mL (factor constante)} \times \text{DO 260nm.}$$

$$1\text{DO}_{260\text{nm}} = 50 \text{ µg de ADN/mL}$$

DO: densidad óptica

6. Calidad del ADN

Se evaluó la calidad de las muestras extraídas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,75% en TBE 1X, coloreado con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). En cada pozo del gel se colocaron 2 µL de tampón de carga con 5 µL de ADN. En uno de los pozos del gel se colocó, como control, 5 µl del fago lambda (200 µg/mL) sin digerir. Se dejó correr a 100 voltios por media hora.

7. SSP-PCR

Para la evaluación del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* se utilizó la técnica de PCR con iniciadores de secuencia específica (SSP-PCR, por sus siglas en inglés Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction). Esta se caracteriza por el uso de un par de iniciadores para cada alelo a estudiar. En esta investigación se usaron los iniciadores diseñados por Smit y col, 2007 (Smit y col, 2007) (Tabla II). Como controles internos de la PCR se utilizaron los iniciadores del grupo sanguíneo ABO descrito por Olsson y colaboradores (Olsson y col., 1998)

Tabla II. Secuencias de los iniciadores utilizados para la determinación de la variante *rs4986791* del gen *TLR4*. Se indica la secuencia de los iniciadores y el tamaño del producto amplificado correspondiente

Gen <i>TLR4</i> <i>rs4986791</i>	Secuencia de los iniciadores	Tamaño del producto amplificado
Alelo C (Thr399)	5'-GAGAGAGGTCCAGGAAGGTC-3' 5'-TCTCAAAGTGATTTTGGGACAA C -3'	406pb
Alelo T (Ile399)	5'-GAGAGAGGTCCAGGAAGGTC 5'-TTCTCAAAGTGATTTTGGGACAA T -3'	406pb
<i>ABO</i>	5'-GCTGGAGGTGCGCGCCTAC-3' 5'-ACGAAITCTACITGTCAGGTGGCTCTCGTC-3''	419 pb

La mezcla de reacción usada fue la siguiente: Tampón de PCR 1X; 0,4 pmol de cada iniciador *rs4986791* (iniciador común e iniciador C o T), 0,1 pmol de cada iniciador del control interno *ABO*; 0,4 mM de tampón Tris-HCl [(NH₄) + Tween 20 + MgCl₂]; 2,5 mM de KCl; 0,2 mM de dNTPs; 1,0 mM de MgCl₂; 0,02 U/μL de la enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen) y H₂O hasta alcanzar un volumen de 9μL. Luego se añadió 1μL de muestra de ADN genómico (200 μg/mL), para un volumen total de 10 μL.

La amplificación se realizó en un termociclador y la condición de la amplificación fue la siguiente: 96°C por un minuto; (96°C por 25 segundos, 70°C por 45 segundos, 75°C por 25 segundos) x 4 ciclos;

(96°C por 25 segundos, 65°C por 50 segundos, 72°C por 30 segundos) x 20 ciclos; (96°C por 30 segundos, 55°C por 60 segundos, 72°C por 90 segundos) x 3 ciclos; 22°C por 10 min.

Los productos amplificados se visualizaron en un gel de agarosa (Sigma) al 1.5%, coloreado con bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron por 35 min a 100 voltios. Como referencia se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100pb.

8. Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas se calcularon mediante conteo directo. La significancia estadística de las diferencias de frecuencias (genotipos, alelos) entre los grupos (Pacientes EA vs. Controles) se estimó por la prueba de ji cuadrado (X^2) Mantel-Haenszel usando tablas de contingencia 2x2. La intensidad de la asociación se calculará como Odds Ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95%. Los valores de (p) se corrigieron multiplicándolos por el número de comparaciones hechas (corrección de Bonferroni) (Svejgaard A Y Ryder LP 1994) y se consideraron significativas cuando el valor de probabilidad (p) fue menor de 0,05.

RESULTADOS

1. Características de los grupo estudiados

En el estudio se incluyeron ciento setenta y dos (n=172) individuos venezolanos, no relacionados, con una edad promedio de 71 ± 10 años, clasificados en 2 grupos.

Casos (n=70): individuos con diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío o esporádico, diagnosticados de acuerdo a los criterios del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos, de la Comunicación y de Accidentes Vasculares Cerebrales (NINCDS) y los criterios de la Asociación para la Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Conexos (ADRDA) [McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, et al. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology 34: 939-944].

Controles (n=102): individuos aparentemente sanos, sin ningún tipo de demencia de acuerdo al miniexamen mental de Folstein (MMSE) [Folstein M, Folstein S, McHugh P (1975) "Minimal state" A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. J Psychiat Res 12: 189-190].

2. Calidad del ADN

Una vez ajustada la concentración del ADN a 200 $\mu\text{g/mL}$, se visualizó en geles de agarosa al 0,75% y se utilizó bromuro de etidio para la detección del ADN en el gel. Esto permitió confirmar si el ADN estaba ajustado a la concentración deseada al compararlo con un patrón ajustado a 200 $\mu\text{g/mL}$ (Fago Lambda). Además, nos permitió evidenciar que el ADN genómico obtenido de las muestras de sangre periférica y almacenado por más de 10 años no estaba degradado

(Figura 9). Al evaluar las muestras de ADN del grupo de pacientes con EA de inicio tardío (n=70), se verificó que nueve de ellas estaban degradadas, por lo tanto, fueron excluidas y el grupo de pacientes quedó conformado por 61 individuos (n=61)

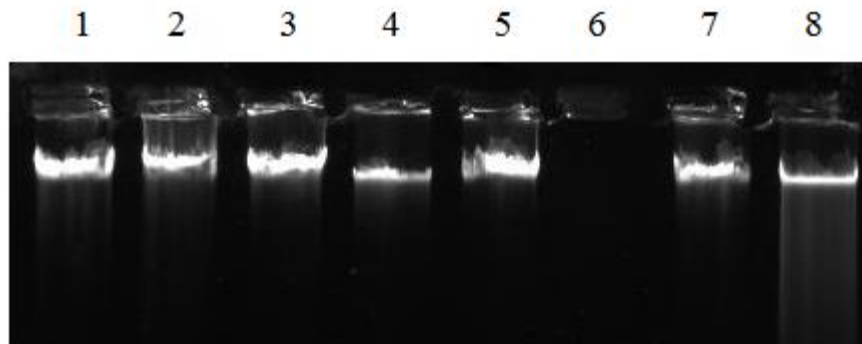


Figura 9. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75%) en buffer TBE 1X. El carril 1 corresponde al fago lambda ajustado a 200 µg/ml (marcador de referencia), los carriles 2 al 8 corresponden a las muestras de ADN de algunos de los individuos incluidos en el estudio. En el carril 6 no se visualiza la muestra de ADN, sugiriendo que la misma se degradó, por lo tanto, se excluyó del estudio.

3. Estudio del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* por PCR-SSP

En la Figura 10 se muestran los productos amplificados correspondientes al alelo C o T, de la variante rs4986791 del gen *TLR4* (406 pb), y al control interno del gen *ABO* (419 pb) en 6 muestras.

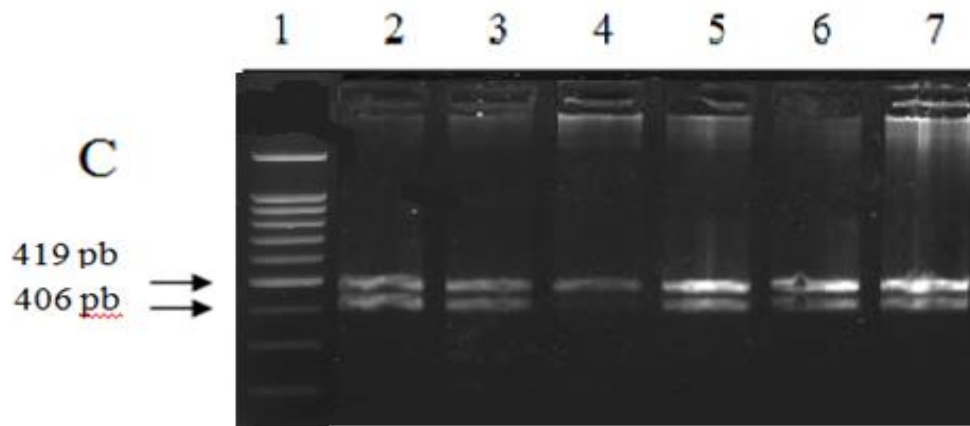


Figura 10. Visualización de los productos amplificados correspondientes al alelo C de la variante rs4986791 del gen *TLR4*, mediante electroforesis de geles de agarosa al 1,5%. Se observa en el carril 1 el marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen) para determinar el tamaño del producto amplificado. Los carriles del 2 al 7 corresponden a muestras de individuos que poseen el alelo C (406 pb). En todos los bolsillos se observa la presencia del control interno (ABO: 419 pb). Control interno (CN).

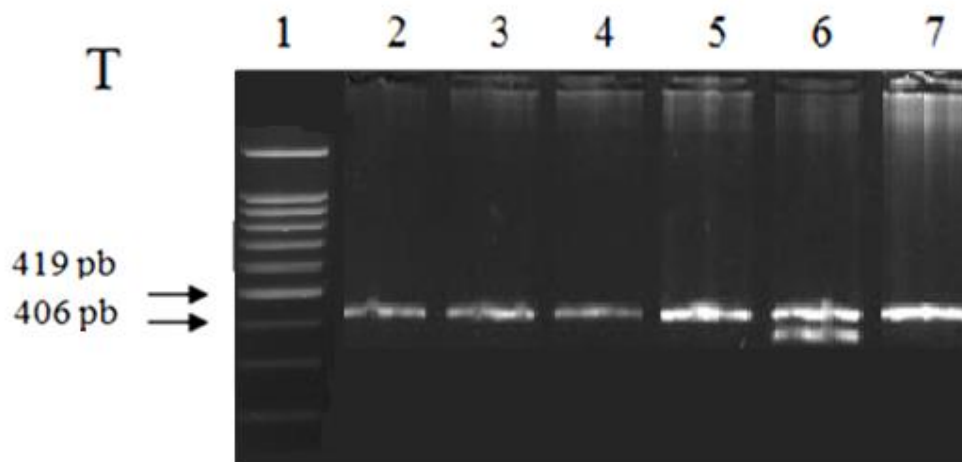


Figura 11. Visualización de los productos amplificados correspondientes al alelo T de la variante rs4986791 del gen *TLR4*, mediante electroforesis de geles de agarosa al 1,5 %. Se observa en el carril 1 el marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen) para determinar el tamaño del producto amplificado. El carril 6 corresponde a la muestra de un individuo que posee el alelo T (406 pb). Los carriles del 2 al 5 y el carril 7 corresponden a muestras de individuos que no poseen el alelo T (ausencia de la banda de 406 pb). En todos los bolsillos se observa la presencia del control interno (ABO: 419 pb). Control interno (CN).

4. Estimación del equilibrio de Hardy Weinberg (H-W) para la distribución genotípica del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* en individuos aparentemente sanos y pacientes con EA de inicio tardío

En ambos grupos estudiados se estimó el equilibrio de H-W para el polimorfismo rs4986791. En los pacientes (n=61) y controles (n=102) se pudo constatar la existencia del equilibrio de Hardy-Weinberg, para la distribución genotípica del polimorfismo rs4986791, es decir, no se observaron diferencias entre las frecuencias esperadas y observadas para cada genotipo (Tabla III).

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

Genotipo rs4986791	Pacientes con EA Frecuencia Observada	Pacientes con EA Frecuencia Esperada	Genotipo rs4986791	Controles Frecuencia Observada	Controles Frecuencia Esperada
CC	59	59	CC	91	91.3
CT	2	2	CT	11	10.4
TT	0	0	TT	0	0.3
Total Individuos	61			102	

Pacientes: $X^2= 0.017$, $p= 0.896$; **Controles:** $X^2= 0.33$, $p= 0.5648$.

5. Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* en pacientes con EA de inicio tardío e individuos aparentemente sanos

Al analizar el polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* en pacientes con EA y controles, observamos solo dos (CC y CT) de los tres genotipos posibles. Tanto en pacientes con EA, como en el grupo control, el genotipo CC presentó la mayor frecuencia (97% y 89.2%,

respectivamente), seguido por el genotipo CT (3% y 10.8%, respectivamente). Asimismo, en ambos grupos observamos una mayor frecuencia del alelo C (98.4% en pacientes y 94.6% en controles) y una menor frecuencia del alelo T (1.6% en pacientes y 5.4% en controles). Al establecer comparaciones de frecuencias entre los grupos, no se observaron diferencias significativas. No obstante, la presencia del genotipo CC (OR: 3.56, IC 95%: 0.7631-16.6627) y el alelo C (OR: 3.42, IC 95%: 0.7451-15.6931) aparentemente confiriendo tres veces mayor riesgo a desarrollar EA.

Tabla IV. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos

	Pacientes EA (n=61)	Controles (n=100)	OR IC 95%	P
Genotipo				
CC	97 (59)	89.2 (89)	3.56 (0.7631-16.6627)	0.07
CT	3 (2)	10.8 (11)	0.28 (0.06-1.3103)	0.07
Alelo				
C	98.4 (120)	94.6 (193)	3.42 (0.7451-15.6931)	0.07
T	1.6 (2)	5.4 (11)	0.29 (0.0637-1.3419)	0.07

Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo o el número de veces que se repite el alelo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

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

En relación con la distribución de las frecuencias de los polimorfismos del gen *APOE*, cabe destacar que de los 102 controles incluidos, solo dos de ellos no se les pudo asignar el genotipo *APOE*. Al analizar la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *APOE* en los pacientes con EA (n=61) y en los controles (n= 100) se observó la presencia de los tres alelos comunes [ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4] en ambos grupos, cinco genotipos *APOE* [ϵ 2/ ϵ 3, ϵ 2/ ϵ 4, ϵ 3/ ϵ 3, ϵ 3/ ϵ 4 y ϵ 4/ ϵ 4] en los pacientes y cuatro genotipos *APOE* [ϵ 2/ ϵ 3, ϵ 3/ ϵ 3, ϵ 3/ ϵ 4 y ϵ 4/ ϵ 4] en los individuos aparentemente sanos. Al establecer comparaciones de frecuencias entre los grupos, se observó en los pacientes con EA una frecuencia significativamente incrementada de los genotipos ϵ 3/ ϵ 4 (OR: 2.61, IC 95%: 1.2955-5.2677, p: 0.003) y ϵ 4/ ϵ 4 (OR: 4.7, IC 95%: 1.4058-15.7522, p: 0.008) con respecto a los controles. En contraste, en los individuos aparentemente sanos los genotipos ϵ 2/ ϵ 3 (OR: 0.094, IC 95%: 0.0121-0.7343, p: 0.003) y ϵ 3/ ϵ 3 (OR: 0.43, IC 95%: 0.2255-0.8292, p: 0.005) presentaban una frecuencia significativamente mayor con respecto a los pacientes. En ambos grupos estudiados el alelo ϵ 3 fue el más frecuente, sin embargo, la frecuencia de este alelo está significativamente incrementada en individuos sanos con respecto a los pacientes con EA (OR: 0.43, 95% IC: 0.2653-0.7124, p: 0.0004). Por el contrario, la frecuencia del alelo ϵ 4 está significativamente incrementada en pacientes con EA con respecto a los individuos sanos (OR=3.57, 95%CI: 2.0849-6.1093, p: 0.000001) (Tabla V).

Tabla V. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs429358 y rs7412 del gen *APOE* en pacientes con EA e individuos aparentemente sanos

Genotipos <i>APOE</i>	Pacientes EA (n=61)	Controles (n=100)	OR IC 95%	p
ε2/ε3	1.64 (1)	15 (15)	0.094 (0.0121-0.7343)	0.003
ε2/ε4	1.64 (1)	0	4.98 (0.1998-124.2621)	0.37
ε3/ε3	39.34 (24)	60 (60)	0.43 (0.2255-0.8292)	0.005
ε3/ε4	40.98 (25)	21 (21)	2.61 (1.2955-5.2677)	0.003
ε4/ε4	16.4 (10)	4 (4)	4.7 (1.4058-15.7522)	0.008
Alelos				
ε2	1.64 (2)	7.5 (15)	0.20 (0.0461-0.9148)	0.016
ε3	60.66 (74)	78 (156)	0.43 (0.2653-0.7124)	0.0004
ε4	37.70 (46)	14.5 (29)	3.57 (2.0849-6.1093)	0.000001

Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo o el número de veces que se repite el alelo para el sitio polimórfico estudiado. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza.

7. Análisis del efecto combinado del polimorfismo del gen *TLR4* y el gen *APOE*.

Una vez determinadas las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* y contando con la información del polimorfismo del gen *APOE* de los individuos que participaron en este estudio, se determinó si habían combinaciones que estuviesen asociadas (positiva o negativamente) con la enfermedad de Alzheimer.

Al establecer comparaciones entre los grupos, se observó una frecuencia incrementada de los genotipos CC/ε2ε3 y CC/ε3ε3 en los controles con respecto a los pacientes con EA, sugiriendo que la presencia de estos genotipos protegen contra el desarrollo de la EA (asociación negativa: protectora). Por el contrario, se observó una frecuencia incrementada de los genotipos CC/ε2ε4 y CC/ε4ε4 en los paciente con respecto a los controles, sugiriendo que estos genotipos confieren susceptibilidad a desarrollar EA (asociación positiva) (Tabla VI)

**TABLA VI. Frecuencias de las combinaciones genotípicas
TLR4/APOE en pacientes con EA e individuos sanos.**

Genotipos TLR4/APOE	Pacientes EA (n=61)	Controles (n=100)	OR IC 95%	P	Asociación
CC/ε2ε3	1.64 (1)	13 (13)	0.11 (0.0142-0.8753)	0.009	Negativa
CC/ ε2ε4	1.64 (1)	0	4.98 (0.1998-124.2621)	0.37	-
CC/ε3ε3	37.71 (23)	52 (52)	0.55 (0.2917-1.0697)	0.039	Negativa
CC/ε3ε4	39.34 (24)	20 (20)	2.59 (1.2757-5.2766)	0.003	Positiva
CC/ε4ε4	16.39 (10)	4 (4)	4.7 (1.4058-15.7522)	0.008	Positiva
CT/ε2ε3	0	2 (2)	0.32 (0.01516-7830)	0.38	-
CT/ε3ε3	1.64 (1)	8 (8)	0.19 (0.0233-1.5714)	0.08	-
CT/ε3ε4	1.64 (1)	1 (1)	1.65 (0.1013-26.8671)	0.47	-

Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo para los sitios polimórficos estudiados. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza

DISCUSION

La EA es considerada una enfermedad neurodegenerativa compleja, progresiva e irreversible del cerebro y representa la forma más común de demencia en la vejez (Vilatela, López-López y Yescas-Gómez, 2012). Los rasgos neuropatológicos de la enfermedad incluyen: depósitos extracelulares del β -amiloide, ovillos neurofibrilares intracelulares y una marcada inflamación. La deposición del β amiloide y de la proteína tau son encontrados en diferentes áreas del cerebro, guiando a la disfunción sináptica, daño mitocondrial y muerte neuronal. La neuroinflamación juega un papel fundamental, aunque aún poco comprendido, en la patogénesis de la LOAD. La inflamación en la EA se caracteriza por microglías reactivas, rodeando las placas β -amiloides, las cuales mantienen un estatus inflamatorio secretando mediadores pro-inflamatorios, contribuyendo así a la pérdida neuronal (Revisado en Doens and Fernández, 2014).

Las microglías en la EA juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad, a través de la limpieza de depósitos β amiloide, iniciación de la actividad fagocítica y la liberación de mediadores citotóxicos. La microglía activada, *in vitro*, por el β -amiloide induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo interleuquina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral - α (TNF- α), quimoquinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, causando el daño neuronal. Los mecanismos a través del cual los depósitos amiloide provocan inflamación no son completamente entendidos. Sin embargo, las microglías expresan varios receptores que cooperan en el reconocimiento, la internalización y la limpieza del β amiloide, así como en la activación celular. Entre los receptores involucrados en esos procesos, se encuentran los TLRs (Revisado en Doens y Fernández, 2014)

La expresión de TLRs en la superficie de la microglía es crucial

como primera línea de defensa contra moléculas exógenas y endógenas. La microglía expresa los TLRs 1 al 9, y muchos de esos receptores han sido asociados, tanto en ratones como en seres humanos, con la activación de la microglía y con neurotoxicidad. Altos niveles de ARN mensajero de TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, y TLR9 han sido detectados en placas asociadas a tejido cerebral en ratones transgénicos APP23. Además, los TLRs han sido implicados en la señalización β -amiloide, disparando una cascada intracelular, resultando en la producción de moléculas pro-inflamatorias y la toma y limpieza de β -amiloides. En general, las investigaciones de TLRs sugieren que esos receptores juegan un papel dual en la patogénesis de la EA. Por una parte, los TLRs son neuroprotectores, debido a su contribución en la limpieza del β amiloide y por otra las respuestas inflamatorias disparadas, a través del reconocimiento del β -amiloide, pueden guiar a efectos neurotóxicos (Revisado en Doens y Fernández, 2014). La neurotoxicidad asociada con la activación microglial resulta de la producción de mediadores neurotóxicos, tales como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, enzimas proteolíticas, glutamato, factores de complemento o citoquinas pro-inflamatorias. Esos productos guían a muerte neuronal como se ha demostrado en modelos murinos y puede contribuir a las condiciones neurodegenerativas crónicas en la EA (Walter y col, 2007).

Diversos estudios sugieren que el receptor TLR4 está directamente involucrado en el reconocimiento, por parte de la microglías, de los depósitos de agregados de A β (Walter y col, 2009; Tahara y col, 2006). Cabe destacar el papel del polimorfismo del gen de este receptor en la EA. En un primer estudio se observó la asociación entre el polimorfismo *rs4986790* del gen *TLR4* y una prevalencia reducida de EA de inicio tardío (Minoretti y col., 2006), mientras que otros dos estudios demostraron que la variante *rs1927907* (Chen y

col, 2012) y rs7045953 (Yu y col, 2012) estaban asociadas con un riesgo incrementado a desarrollar EA de inicio tardío.

Dado que los polimorfismos no sinónimos, rs4986790 (transición A/G) y rs4986791 (transición C/T) causan un cambio de aminoácido en el dominio extracelular de ese receptor, afectando la respuesta fisiológica al LPS, atenuándola o aboliéndola, por lo tanto, reduciendo su capacidad de evocar inflamación, se determinó la distribución del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4*, así como su correlación con los genotipos de los polimorfismos rs429358 Y rs7412 del gen *APOE* en pacientes con enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

Distribución del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* en población sana

El polimorfismo rs4986791 (1196 C>T), genera el cambio de una treonina por una isoleucina en el aminoácido 399, ubicado en la región extracelular del receptor, afectando la interacción con su ligando. En el presente estudio la distribución de frecuencia de los genotipos del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* se encontró en equilibrio en los individuos aparentemente sanos (controles), indicando que esta población cumple con las hipótesis del equilibrio de Hardy-Weinberg:

1. La población es panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar: panmixia).
2. La población es suficientemente grande (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos)
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).
4. Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

Al comparar las frecuencias de los genotipos del polimorfismo

rs4986791 del gen *TLR4* del grupo de individuos aparentemente sanos (controles) con las descritas en otras poblaciones, se observa que el genotipo homocigoto CC es el más frecuente, seguido por el genotipo heterocigoto CT. Además, destaca que en muy pocas poblaciones se ha descrito la presencia del genotipo homocigoto TT. (Tabla VII)

Tabla VII. Frecuencia de los genotipos del polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* en distintas poblaciones. (Modificado de Ziakas y col, 2013)

Población	Genotipos del polimorfismo rs4986791 del gen <i>TLR4</i>		
	C/C	C/T	T/T
Venezuela (n=100)	89(89)	11(11)	0(0)
África Este (n= 195)	91,8(179)	7,7(15)	0,5(1)
Alemania (n= 112)	87,5(98)	11,6(13)	0,9(1)
Alemania (n= 80)	88,8(71)	11,3(9)	0(0)
Alemania (n= 80)	91,3(73)	8,8(7)	0(0)
Alemania (n= 244)	96,3(235)	3,7(9)	0(0)
Alemania (n= 76)	89,5(68)	10,5(8)	0(0)
Australia (n= 409)	89,2(365)	10,5(43)	0,2(1)
Checoslovaquia (n= 218)	89,9(196)	10,1(22)	0(0)
Checoslovaquia (n= 252)	86,9(219)	13,1(33)	0(0)
Chile Norte (n= 45)	93,3(42)	6,7(3)	0(0)
Colombia (n= 291)	96,9(282)	3,1(9)	0(0)
Colombia (n= 299)	91(272)	8,7(26)	0,3(1)
España (n= 155)	85,8(133)	14,2(22)	0(0)
Estados Unidos (n= 316)	87,7(277)	11,1(35)	1,3(4)
Estados Unidos (n=463)	85,3(395)	13,8(64)	0,9(4)
Estados Unidos (n=344)	91,9(316)	8,1(28)	0(0)
Estonia (n= 323)	88,9(287)	10,8(35)	0,3(1)
Europa occidental (n= 92)	80,4(74)	19,6(18)	0(0)
Ghana (n= 290)	97,6(283)	2,4(7)	0(0)
Grecia (n= 222)	86,5(192)	13,5(30)	0(0)
Grecia (n= 289)	90,7(262)	9,3(27)	0(0)
Holanda (n= 99)	90,9(90)	8,1(8)	1(1)
Hungría (n= 118)	91,5(108)	8,5(10)	0(0)
India (n= 200)	94(188)	5,5(11)	0,5(1)
India (n= 150)	93,3(140)	6(9)	0,7(1)

India (n= 250)	82,4(206)	17,2(43)	0,4(1)
Inglaterra (n= 95)	82,1(78)	17,9(17)	0(0)
Irán (n= 155)	88,4(137)	11,6(18)	0(0)
Irán (n= 320)	84,4(270)	15,6(50)	0(0)
Irán Norte (n= 75)	98,7(74)	1,3(1)	0(0)
Malasia (n= 250)	96,8(242)	3,2(8)	0(0)
Sur India (n= 203)	74,9(152)	22,7(46)	2,5(5)
Tailandia (n= 1402)	98,4(1379)	1,6(22)	0,1(1)
Turquía (n= 155)	95,5(148)	4,5(7)	0(0)

Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo para los sitios polimórficos estudiados. La frecuencia está expresada en porcentaje.

Asociación entre el polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* y el riesgo a padecer EA

Diversos estudios han sugerido que el polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* está asociado a distintas enfermedades como Leishmaniasis cutánea (susceptibilidad) (Ajdary y col, 2011), lepra (protección) (Bochud y col, 2009), neurocisticercosis (susceptibilidad) (Verma y col, 2007), osteomielitis (susceptibilidad) (Montes y col, 2006), fiebre tifoidea (susceptibilidad) (Bhuvanendran, y col, 2011), Sin embargo, no está claro por qué este polimorfismo incrementa la susceptibilidad a ciertas infecciones, pero confiere protección para otras, sugiriendo que la respuesta del sistema inmunitario dispara una respuesta inflamatoria protectora en ciertas enfermedades, mientras que en otras esa respuesta puede ser causal de la patogenicidad (Ziakas y col, 2013).

En el presente estudio al comparar la frecuencia de los genotipos CC y CT entre pacientes y controles no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, la presencia del genotipo CC (OR: 3.56, IC 95%: 0.7631-16.6627) y el alelo C (OR: 3.42, IC 95%: 0.7451-15.6931) aparentemente confieren tres veces mayor riesgo a desarrollar EA. Debido a que el límite inferior del intervalo de confianza es menor que 1, indica que hay asociación, pero no es causal, sugiriendo que otras

variantes del gen *TLR4* pudiesen estar confiriendo susceptibilidad a desarrollar EA de inicio tardío, como se ha descrito previamente en la literatura (Minorette y col., 2006; Chen y col, 2012; Yu y col, 2012)

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

Al establecer comparaciones de frecuencias entre los grupos, se observó una frecuencia significativamente incrementada de los genotipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ (OR: 2.61, p: 0.003) y $\epsilon 4/\epsilon 4$ (OR: 4.7, p: 0.008) en los pacientes con EA y una frecuencia significativamente incrementada de los genotipos $\epsilon 2/\epsilon 3$ (OR: 0.094, p: 0.003) y $\epsilon 3/\epsilon 3$ (OR: 0.43, p: 0.005) en los controles. Además, se observó una frecuencia incrementada del alelo $\epsilon 3$ en individuos aparentemente sanos (OR: 0.43, p: 0.0004) y del alelo $\epsilon 4$ en pacientes con EA (OR=3.57, p: 0.000001). Estos resultados confirman lo descrito en la literatura, que el alelo $\epsilon 4$ del gen codificante de la apolipoproteína E (*APOE*) es el principal factor de riesgo de la EA de inicio tardío (Revisado en: Saul y Wirths, 2016; Dorey y col, 2014; Eehalt y col, 2003).

Se ha tratado de explicar la asociación del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* con el desarrollo de la EA de inicio tardío, relacionándolo con la distribución de lípidos en la membrana, mantenimiento del balance redox y la modulación de la producción de energía mitocondrial (Brown y col, 2002). Sin embargo, la teoría que ha tomado más fuerza es que la *APOE* juega un papel en la neuroinflamación y la inmunidad innata, específicamente en la activación de las microglías. De hecho, varios estudios sugieren que las microglías de genotipo *APOE4* provocan una respuesta inflamatoria más vigorosa con respecto a las microglías con genotipo *APOE3* o *APOE2* (Brown y col, 2002; Vitek, Brown y Colton, 2010).

Además, el efecto es dosis-dependiente, es decir, que los individuos con dos alelos $\epsilon 4$ tienen mayor riesgo de desarrollar EA de inicio tardío que los individuos con una copia de este alelo. Cabe destacar, que en el presente estudio, observamos que la presencia de los dos alelo $\epsilon 4$ duplica el riesgo conferido por un alelo $\epsilon 4$ (4.7 vs 2.61, respectivamente).

Correlación de los genotipos del polimorfismo *rs4986791* del gen *TLR4* con los genotipos (*rs429358* y *rs7412*) del gen *APOE* y el riesgo a padecer EA.

Al establecer comparaciones entre los grupos, se observaron asociaciones negativas (protectoras) y positivas (susceptibilidad) entre genotipos *TLR4/APOE* y el desarrollo de EA. Para verificar si había un efecto aditivo o sinérgico entre los genotipos *TLR4* y la presencia (+) o ausencia (-) del alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*, se establecieron las comparaciones indicadas en la tabla VIII.

Tabla VIII. Comparaciones de frecuencias del genotipo *TLR4*/alelo *APOE* entre pacientes y controles

Genotipo <i>TLR4</i>/ alelo <i>APOE</i>	Pacientes EA (n=59)	Controles (n=89)	OR IC 95%	p
CC/$\epsilon 4$ -	40,7 (24)	73,0 (65)	0.25 (0.1258-0.5094)	0.000044
CC/ $\epsilon 4$ +	59,3 (35)	27,0(24)	3.94 (1.9628-7.9474)	0.000044

Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo/alelo para los sitios polimórficos estudiados. La frecuencia está expresada en porcentaje. OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza

Como se puede observar la presencia del alelo $\epsilon 4$ en los individuos con el genotipo CC confiere susceptibilidad a desarrollar EA,

indicando los límites del intervalo de confianza que hay una asociación causal, que confiere susceptibilidad. Por otra parte, la ausencia del alelo $\epsilon 4$ en los individuos con el genotipo CC no confiere susceptibilidad, indicando los límites del intervalo de confianza que hay una asociación no causal, que es protectora, es decir la presencia del alelo C no necesariamente protege contra el desarrollo de la EA. Además, cabe destacar, que el OR conferido por el alelo $\epsilon 4$ permanece igual en ausencia o presencia del genotipo CC del *TLR4*. Los resultados obtenidos contrastan con el estudio de Yen-Ching Chen y colaboradores, quienes determinaron que la variante rs1927907 de *TLR4* estaba asociada con un riesgo incrementado a desarrollar EA de inicio tardío, especialmente en pacientes que no portaban el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* (Chen y col, 2012).

Hemos discutido ampliamente en estos párrafos el papel que juega *TLR4* en esta nefasta enfermedad. Hemos señalado, también, que otros autores han hallado asociaciones entre polimorfismos de dicho gen con esta enfermedad. Por tanto, caía de maduro la necesidad de realizar un estudio del polimorfismo rs4986791, el cual no había sido estudiado previamente. Ahora, después de este estudio podemos afirmar con algunas certezas que el polimorfismo rs4986791 del gen *TLR4* no está asociado a susceptibilidad o protección a la EA de inicio tardío por sí solo. Sin embargo, los brazos cortos de este estudio no alcanzaron a estimar si este polimorfismo aumenta su influencia en la enfermedad si se ve en relación con otros polimorfismo de este gen o de otros genes. No hay que olvidar que esta es una enfermedad multifactorial, y que debe a la interacción entre varios genes. Así, pues, como sugerencia a los investigadores que sigan esta línea de estudio, recomendamos que se enfoquen en haplotipos de más de dos polimorfismos.

Cualquiera con un entendimiento afinado que leyera dos o tres

publicaciones de este asunto comprenderá la fragilidad de los modelos que están detrás de la enfermedad y lo complejo que resulta su estudio. Lo cual, para buen investigador, es la mejor motivación: saber de que aún queda mucho camino por recorrer.

Para finalizar, nos gustaría cerrar con una buena noticia: la del desarrollo de un prometedor fármaco, publicado recientemente en la revista Nature, que ya está siendo probado en humano. El nuevo tratamiento se basa en anticuerpos humanos que disminuyen la cantidad de proteínas beta-amiloide localizadas en el cerebro de los pacientes con Alzheimer leve, obstaculizando el avance del deterioro cognitivo en sus fases más iniciales (Sevigny y col, 2016).

CONCLUSIONES

1. El polimorfismo *rs4986791* del gen *TLR4* no está asociado con el desarrollo de la EA de inicio tardío en población venezolana
2. El alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* confiere riesgo a desarrollar EA de inicio tardío en nuestra población. Siendo el efecto dosis-dependiente, es decir, que los individuos con dos alelos $\epsilon 4$ tienen más riesgo que los individuos con una copia de este alelo
3. Se observaron asociaciones negativas (protectoras) y positivas (susceptibilidad) entre genotipos *TLR4/APOE* y el desarrollo de EA.
4. Otras variantes del gen *TLR4* pudiesen estar confiriendo susceptibilidad a desarrollar EA de inicio tardío en nuestra población

BIBLIOGRAFÍA

Ajdary,S., Ghamilouie, M., Alimohammadian, M., Riazi-Rad, F., Pakzad, S., 2011 Toll-like receptor 4 polymorphisms predispose to cutaneous *leishmaniasis*. *Microbes Infect.* **13**: 226-231.

Alonso, M., López-López, M., Yescas, P. (2012) Genetics of Alzheimer's Disease *Arch Med Res.* **43**(8): 622-631

Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia*.

Balistreri, C., Colonna-Romano, G., Lio, D., Candore, G., Caruso, C. 2009.TLR4 Polymorphisms and Ageing: Implications for the Pathophysiology of Age-Related Diseases. *J Clin Immunol* **29**:406–415

Barage, S., Sonawane, K. (2015) Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **52**:1-18

Berchtold, N., Cotman, C. 1998. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Greco-Roman Period to the 1960s. *Neurobiol Aging.* 19(3):173–189.

Berglund, L. 2005.Apolipoproteína E: ¿Un Candidato Importante para la Interacción entre Genes y Nutrientes? *Sociedad Iberoamericana de información científica.* **4**(6)

Bhuvanendran, S., Hussin, H., Meran, L., Anthony, A., Zhang, L. y col. (2011) Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and typhoid susceptibility in Asian Malay population in Malaysia. *Microbes Infect* **13**: 844-851

Bochud, P., Sinsimer, D., Aderem, A., Siddiqui, R., Saunderson, P. y col. 2009 Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **28**: 1055-1065.

Bonham, L., Desikan, R., Yokoyama, J. 2016 The relationship between complement factor C3, APOE ϵ 4, amyloid and tau in Alzheimer's disease. *Act Neurop Comm.* **4**: 65.

Boutajangout, A., Wisniewski, T. 2013. The Innate Immune System in Alzheimer's. *International Journal of Cell Biology*. Article ID 576383.

Brown, C., Wright, E., Colton, C., Sullivan, P., Laskowitz, D., Vitek, M. (2002) Apolipoprotein E isoform mediated regulation of nitric oxide release. *Free Radic Biol Med.* **32**:1071–1075.

Burns, A., Iliffe, S. 2009. Alzheimer's Disease. *BMJ.* **338**: b158.

Bunce M. 2000. PCR-SSP typing in histocompatibility testing. Bidwell and Navarrette C. *Imperial Collage Press, London*, pp. 149-186.

Canedo, G., Moscoso, Z. 2013. Prevención del Alzheimer: efecto neuroprotector del ácido docosahexaenoico (DHA) en membranas plasmáticas neuronales. *SCIENTIFICA.* **11**(1)

Carrasquillo, M., Bu G., Nielsen, H. 2013. Apolipoprotein E. Morgan K. and Carrasquillo M.M. (eds.). *Genetic Variants in Alzheimer's Disease*. Springer Science, New York.

Carty M., Bowie, A.G. 2010. Recent insights into the role of Toll-like receptor in viral infection. *Clinical and Experimental Immunology* **161** (3): 397–406

Chrzęszczyk, D., Konopka, T., Ziętek, M. 2015. Polymorphisms of Toll-Like Receptor 4 as a Risk Factor for Periodontitis: Meta-Analysis. *Adv Clin Exp Med*. **24**(6):1059-70.

Chen, Y., Yip, P., Huang, Y., Sun, Y., Wen, L., y col. 2012. Sequence variants of toll like receptor 4 and late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. **7**: e50771

Cordy, J., Hooper, N., Turner, A. 2006. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease (Review). *Molecular Membrane Biology*. **23**(1): 111-122

Cras, P., Kawai, M., Lowery, D., Gonzalez-DeWhitt, P., Greenberg, B., Perry, G. 1991. "Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88** (17): 7552–7556.

De Paula V.J, Meira Guimarães F., Satler Diniz B., Forlenza O.V. 2009. Neurobiological pathways to Alzheimer's disease Amyloid-beta, Tau protein or both? *Dementia & Neuropsychologia* **3** (3):188-194

Di Paolo, G., Kim, T. 2011. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci*. **12** (8): 284-296

Doens, A., Fernández, P. 2014. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation*. **11**:48

Domínguez, A., Zentella, A., Velázquez, J. 2009. Control Molecular de la Inflamación: Regulación de los Receptores Tipo Toll. *REB*. **28** (4): 125-131

Dorey, E., Chang, N., Yan Liu, Q., Yang, Z. 2014. Apolipoprotein E, amyloid-beta, and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. **30** (2): 317–330.

Downer, J. 2013. Toll-Like Receptor Signaling in Alzheimer's Disease Progression. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. **10**: 006.

Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Christoph Thiele, C., Simons, K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*. **160**(1): 113–123

Gaikwad, S., Patel, D., Naveen., Agrawal-Rajput, R. 2015 The critical role of JNK and p38 MAPKs for TLR4 induced microgliamediated neurotoxicity. *Euro. J. Exp. Bio*. **5**(8):34-42

Gay N, Gangloff M., Weber A. 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nature Reviews Immunology* **6** (9): 693-698.

Hanke, M.L, Kielian, T. 2011. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* **121**(9): 367–387.

Harry. G, Kraft., A. 2008. Neuroinflammation and Microglia: Considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. **4**(10): 1265–1277

Heppner, F., Ransohoff, R., Becher, B. 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. **16**(6):358-372

Jin, J., Kim, H., Maxwell, A., Li, L., Fukuchi, K. 2008. Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflamm*. **5**:23

Kim, J., Basak, J., Holtzman, D. 2009. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*. **63**(3): 287–303.

Krishnaswamy, S., Verdile, G., Groth, D., Kanyenda, L., Martins, R., 2009. The structure and function of Alzheimer's gamma Secretase

Enzyme Complex. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*. **46**(5-6): 282–301

Lu, Y., Yeh, W., Ohashi, P. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**:145–151

Menéndez, S., Padrón, N., Llibre, J. 2002. Péptido beta Amiloide, Proteína Tau y Enfermedad de Alzheimer. *Cubana Invest Biomed*. **21**(4):253-61

Meyer, M., Tschanz, J., Norton, M., Welsh-Bohmer, K. y col. 1998. APOE genotype predicts when — not whether — one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nature Genetics*. **19**: 321 - 322

Michaud, J., Hallé, M., Lampron, A., Thériault, P., Préfontaine, P., Filali, M., Tribout-Jover, P. y col. 2013. Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *PNAS*. **110**(5) : 1941–1946

Micheli, F., Martín, A., Aconapé, J., Pardal, M., Biller, J. 2003. Tratado de Neurología Clínica. España: Medica Panamericana.

Minati, L., Edginton, T., Bruzzone, M., Giaccone, G. 2008. Current Concepts in Alzheimer's Disease: A Multidisciplinary Review. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*. **24**: 95

Minoretti, P., Gazzaruso, C., Di Vito, C., Emanuele, E., Bianchi, M., Coen, E. 2006. Effect of the functional toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism on susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. **391**: 147–149.

Montes, A., Asensi, V., Alvarez, V., Valle, E., Ocaña, M. y col. (2006) The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol* **143**: 404-413.

Morrow, J., Hatters, D., Lu, B., Hochtl, P., Oberg, K., Rupp, B., y col. 2002. Apolipoprotein E4 forms a molten globule. A potential basis for its association with disease. *J Biol Chem.***277**: 50380–50385.

Murphy, K. 2012. Janeway's Immunobiology. Editorial Garland Science 8va edicion, New York, USA.

Osamu, T., Shizuo, A. 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunological Reviews* **227**: 75–86.

Patterson, C., Feightner, J., Garcia, A., Hsiung, G., MacKnight, C., Sadovnick, A. 2008. Diagnosis and treatment of dementia:1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *CMAJ.***178**: 548–556.

Pérez, S. 2008. Estudios sobre la fosforilación y agregación de la proteína Tau y su posible relación con la enfermedad de Alzheimer. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España.

Poirier, J., Bertrand, P., Kogan, S., Gauthier, S., Davignon, J. 1993. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet.* **342**(8873): 697-699.

Roses A. 1996. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med.***47**: 387–400.

Sabbagh, M., Sandhu, S., Kolody, H., Lahti, T., Silverberg, N., Sparks, L. 2006. Studies on the effect of the apolipoprotein E genotype on the lipid profile in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer's Res.* **3**:157–60

Saul, A., Wirths, O. 2016. Endogenous Apolipoprotein E (ApoE) Fragmentation Is Linked to Amyloid Pathology in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*: 1-9

Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. 2016. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. **537**: 50–56

Smit, L., Bongers, S., Ruven, H., Rijkers, G., Wouters, I., Heederik, D., Omland, Ø., Sigsgaard, T. 2007. Atopy and new-onset asthma in young Danish farmers and CD14, TLR2, and TLR4 genetic polymorphisms: a nested case-control study. *Clinical and Experimental Allergy*. **37**: 1602–1608

Strittmatter, W., Saunders, A., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G., Roses, A. 1993. Medical Sciences Apolipoprotein E: High-avidity binding to, B-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**(5): 1977–1981

Svejgaard, A., Ryder, L.P. 1994. HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens* **43**: 18

Tahara, K., Kim, H., Jin, J., Maxwell, A., Li, L., Fukuchi, K. 2006. Role of toll-like receptor signalling in A β uptake and clearance. *Brain*. **129**(11): 3006–3019.

Tang, M., Stern, Y., Marder, K., Bell, K., y col. 1998. The APOE- ϵ 4 Allele and the Risk of Alzheimer Disease Among African Americans, Whites, and Hispanics. *JAMA*. **279**(10):751-755

Vaure, C., Liu, Y. 2014. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front. Immunol*. **5**:316

Verma, A., Prasad, K., Gupta, R., Singh, A., Nyati, K., y col. 2010. Toll-like receptor 4 polymorphism and its association with symptomatic neurocysticercosis. *J Infect Dis*. **202**: 1219-1225.

Vetrivel, K., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Wong, P., Xu, H., Thinakaran, G. 2004. Association of γ -Secretase with Lipid Rafts in Post-Golgi and Endosome Membranes. *The Journal of Biological Chemistry* .**279** (43): 44945–44954.

Vilatela, ME., López-López, M., Yescas-Gómez, P. 2012. Genetics of Alzheimer's Disease. *Arch Med Res*. 43(8): 593-710.

Vitek, M., Brown, C., Coltona, C. 2009. APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiol Aging*. **30**(9): 1350–1360.

Walter, S., Letiembre, M., Liu, Y., Heine, H., Penke, B., Hao, W., Bode, B., y col. 2007. Role of the Toll-Like Receptor 4 in Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Cell Physiol Biochem*. **20**: 947-956

Yu, J., Miao, D., Cui, W., Ou, J., Tian, Y., Wu, Z., Zhang, W., Tan, L. 2012. Common Variants in Toll-Like Receptor 4 Confer Susceptibility to Alzheimer's Disease in a Han Chinese Population. *Curr Alzheimer Res*. 9: 458-466

Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G., y col. 2012. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell* **147**(4): 868–880.

Ziakas, P., Prodromou, M., El Khoury, J., Zintzaras, E., Mylonakis, E. 2013. The Role of TLR4 896 A>G and 1196 C>T in Susceptibility to Infections: A Review and Meta-Analysis of Genetic Association Studies. *Plos ONE*.

