



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio de asociación de SNPs en los genes APP,
DYRK1A y RUNX1 con la Enfermedad de Alzheimer de
inicio tardío en una muestra de pacientes mexicanos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ZENYESE NÁJERA GARCÍA



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Carlos Alberto Venegas Vega
2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Susana Kofman por permitirme trabajar en el laboratorio de Genética del HGM, un espacio de aprendizaje y crecimiento continuo para los estudiantes.

Para el Dr. Carlos Venegas por su apoyo, consejos y confianza que me guiaron hasta concluir con este trabajo que tan sólo es el inicio de un maravilloso proyecto de investigación.

Al M. en C. Fernando Fernández, quien no sólo me transmitió conocimientos con calidez y paciencia, sino que festejó los logros de mi tesis y me ayudó en momentos de angustia y desesperación.

A mis sinodales: la Dra. Rosario Rodríguez, el M. en C. Alfonso Vilchis y el M. en I.B.B. Simón Guzmán por su dedicación, sus amables consejos y sobre todo por colaborar al mejoramiento de mi trabajo.

De corazón, infinitas gracias:

A mis padres por ayudarme de 1357 formas a llegar hasta este momento. A mamá por su cariño incondicional y por guiar mi camino para ser una persona disciplinada y de valores muy claros. Le debo lo que soy!

A mis m&m's: Kary por estar siempre presente y apoyarme no solo con palabras sino con hechos que me han servido de ejemplo. Naye que descubrió y compartió conmigo el hermoso mundo de la Biología y siempre me ha ayudado como hermana y como profesional!

A mi hermanita menor Metz por su cariño, los ratos divertidos y el interés que muestra en ayudarme durante nuestras charlas nocturnas!
Valoro mucho a mi familia, gracias por todo!

De qué manera podría expresar mi gratitud a Eduardiko? Ha sido una persona clave en mi vida. Me ha dado incontables momentos extraordinarios, muchísimas buenas experiencias y también algunos malos ratos, pero de todos he aprendido bastante. Gracias por ser taaan paciente, tierno, comprensivo, divertido, atento... además de escucharme, apoyarme y ayudarme siempre!

A los actores contratados: Romanillo, Barniman, Lu, Miguel y Rox por los momentos inigualables que compartieron y comparten conmigo (fabulosos días en campo, trabajos en equipo, cumpleaños, fiestas, películas y demás); por sus consejos durante mis crisis y por estar allí simplemente, acompañándome!
También a Clo, Tania, Chepe, Amílcar y Néstor, de quienes también tengo recuerdos muy especiales.

A Javs, por hacer más ligero mi camino hacia la titulación y por compartir conmigo más que una mesa de trabajo!

A Raulito, quien siempre tiene tiempo para escucharme (o leerme) y sentir mi felicidad así como sacudirme en tiempos difíciles. Quien estuvo presente durante los desvelos escolares y me regala su encantadora compañía en noches de insomnio!

Me costaría mucho mencionar a todos los del Museo de la Luz, así que éste es un agradecimiento generalizado por lo mucho que evolucioné gracias a sus, tan diversos e interesantes, puntos de vista y conocimientos que me aportan.

Gracias a los maestros de mi adorada Facultad de Ciencias que participaron en mi desarrollo profesional y dejaron en mi la semilla de siempre querer aprender más.

Y antes de terminar una dedicatoria especial para abuelita Carmen, Cielo, Quetz y Miguel, quienes estuvieron en un breve lapso de mi vida pero me dejaron huellas imborrables.

Y a todos los que quedaron escondidos en algún lugar de mi memoria

GRACIAS!!! ☺

Zenyese

ÍNDICE

| | página |
|---|--------|
| Resumen/Abstract | 6 |
| Abreviaturas | 8 |
| I. Introducción | |
| 1.1 Antecedentes | 9 |
| 1.2 Factores de riesgo | 10 |
| 1.3 Diagnóstico clínico | 11 |
| 1.4 Histopatología | 12 |
| 1.5 Placas seniles y Marañas neurofibrilares | 14 |
| 1.6 Metabolismo de la Proteína Precursora del Amiloide | 16 |
| 1.7 Genes implicados en la Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano | 17 |
| 1.8 Hipótesis de la cascada de Amiloide | 17 |
| 1.9 Genes implicados en la Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío | 19 |
| 1.10 Polimorfismos de un solo nucleótido | 20 |
| 1.11 Estudio de ligamiento y asociación | |
| - APP | 21 |
| - DYRK1A | 22 |
| - RUNX1 | 22 |
| II. Justificación | 24 |
| III. Objetivo | 25 |
| IV. Material y Método | 26 |
| V. Resultados | 31 |
| VI. Discusión | 49 |
| VII. Conclusiones | 52 |
| VIII. Referencias | 53 |
| IX. Glosario | 64 |
| X. Anexos | |
| A. Carta compromiso | 67 |
| B. Criterios de DSM-IV para el diagnóstico de la EA | 68 |
| C. Protocolo para purificar ADN de 0.4 a 3.0 mL de sangre | 68 |
| D. SNPs estudiados | 70 |

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) de inicio tardío es un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta la cognición y la memoria. Trabajos recientes en diversas poblaciones han demostrado que algunas variantes alélicas del gen APOE (apolipoprotein E) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en los genes APP (Amyloid Precursor Protein), DYRK1A (dual-specificity tyrosine (Y) phosphorylation-regulated kinase 1A) y RUNX1 (Runt-related transcription factor 1); aumentan la susceptibilidad al desarrollo de dicha enfermedad. En este estudio de casos y controles se realizó el análisis de las variantes alélicas del gen APOE y SNPs en los genes APP (rs364048), RUNX1 (rs4816501) y DYRK1A (rs2835740) -éstos tres últimos localizados en el cromosoma 21- mediante la técnica de PCR tiempo real (PCR-Q) con el fin de evaluar la posible asociación de estos SNPs con la EA de inicio tardío en población mexicana. Fueron estudiados 68 pacientes con la EA de inicio tardío pareados por edad y sexo con 70 controles. Encontramos lo siguiente: APOE ($\epsilon 3/\epsilon 4$) OR=1.98, APP (AA) OR= 1.69, DYRK1A (CC) OR=1.03 y RUNX1 (TT) OR=5.79. Nuestros datos sugieren una asociación entre los genes APOE, APP y RUNX1 con la EA de inicio tardío en población mexicana.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, SNPs, APP, DYRK1A, RUNX1

ABSTRACT

Late-onset Alzheimer disease (LOAD) is a neurodegenerative progressive disorder that affects cognition and memory. Recent studies in several populations indicate that allelic variants in APOE (apolipoprotein E) gene and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in APP (Amyloid Precursor Protein), DYRK1A (dual-specificity tyrosine (Y) phosphorylation-regulated kinase 1A) and RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) genes are risk factors for LOAD. In this case-control study was realized an analysis of allelic variants of APOE and APP (rs364048), RUNX1 (rs4816501) and DYRK1A (rs2835740) SNPs –these three last genes are located on chromosome 21- by real time PCR (Q-PCR) to evaluate the possible association between SNPs and LOAD in Mexican population. We analyzed 68 patients with LOAD and 70 sex and age matched controls subjects. We found: APOE ($\epsilon 3/\epsilon 4$) OR=1.98, APP (AA) OR=1.69, DYRK1A (CC) OR=1.03 and RUNX1 (TT) OR=5.79. Our data suggested an association between APOE, APP and RUNX1 genes with LOAD in Mexican population.

Key words: LOAD, SNPs, APP, DYRK1A, RUNX1

ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| A β | Amiloide β |
| aa | Aminoácido |
| ADNg | Ácido desoxirribonucleico genómico |
| ApoE | Apolipoproteína E |
| DSM-IV | Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales) |
| EA | Enfermedad de Alzheimer |
| GR | Genotipo de riesgo |
| HG | Hospital General |
| INN | Instituto Nacional de Nutrición |
| INNN | Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| LBD | Lipoproteína de Baja Densidad |
| MNF | Marañas neurofibrilares |
| OR | <i>Odds ratio</i> |
| APP | Proteína Precursora del Amiloide |
| PS | Placas seniles |
| PS1 | Presenilina 1 |
| PS2 | Presenilina 2 |
| PCR-Q | Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa |
| RM | Resonancia Magnética |
| SD | Síndrome de Down |
| Ser | Serina |
| SNPs | Polimorfismo de un solo nucleótido |
| TAC | Tomografía Axial Computarizada |
| TCE | Traumatismo craneoencefálico |
| Thr | Treonina |

I. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

En 1907, Alois Alzheimer describió el caso clínico de una mujer (Auguste D.) de 51 años que comenzó a sufrir un delirio de celos contra su marido, seguido de una pérdida de memoria y de un rápido deterioro cognitivo, desorientación espacial, realización de actividades sin sentido (llevando las cosas de un lado a otro o escondiéndolas), agresividad, delirio de persecución, llanto, alteraciones del sueño y que finalmente falleció tras cuatro años y medio de evolución en estado de total invalidez. Alois describió las características clínicas y anatomopatológicas de la enfermedad que llevaría su nombre, lo que él denominó degeneración neurofibrilar. El examen *post mortem* en esta paciente reveló una atrofia cerebral y lesiones específicas que describió como focos miliares y manojo de fibrillas entre las células nerviosas [1, 2].

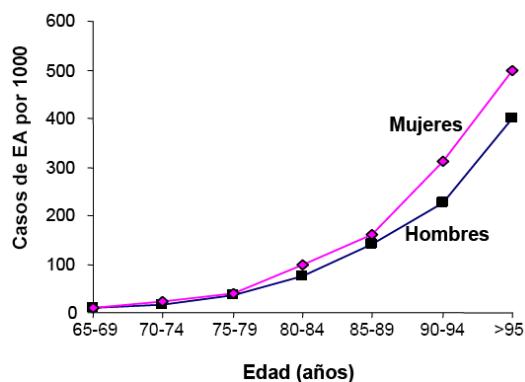
La enfermedad de Alzheimer (**EA**) fue considerada durante casi 70 años, un tipo de demencia rara de escasa prevalencia en la población general. Posteriormente se hizo notar que la mayoría de las personas de edad avanzada con declive cognitivo presentaban la enfermedad clínica y patológicamente descrita por Alois Alzheimer; siendo en la actualidad un problema de salud pública [2]. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, demencia se define como un síndrome debido a una enfermedad del cerebro, generalmente de naturaleza progresiva, en la que hay déficits de múltiples funciones corticales superiores, entre las que se encuentran alteraciones de la memoria, juicio, pensamiento, orientación, comprensión, cálculo y lenguaje (Fundación Alzheimer). Se ha demostrado que las demencias asociadas a la edad toman cada vez mayor importancia en países industrializados, cuya expectativa de vida ha aumentado durante los últimos 20 años, aproximadamente dos años por década [3]. La EA es la demencia más común, representando entre el 50-60% de todos los casos a nivel mundial. La prevalencia de esta demencia es <1% en individuos de 60 a 64 años, pero presenta un comportamiento casi exponencial al incrementar la edad, de manera tal que en personas mayores de 85 años la prevalencia es entre 24-33% en países occidentales. Se estima que tan solo en el 2001, a nivel mundial existían más de 24 millones de personas afectadas con EA, un número que se prevé se duplicará cada 20 años hasta llegar a 81 millones de casos en el 2040 [4].

La EA es un desorden neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por afectar la cognición y la memoria [5]. Los primeros síntomas de la enfermedad están asociados a episodios de pérdida de memoria y dificultad con el lenguaje; seguido de disfunciones visuales, espaciales y de comportamiento [2]. Entre los síntomas psicológicos y de conducta que se presentan frecuentemente se incluyen: depresión, euforia, agitación, agresión, psicosis, desinhibición, irritabilidad, apatía y comportamientos motores aberrantes [6]. La desnutrición y la aparición de infecciones, debido a la pérdida de autonomía, son los eventos más perjudiciales en la salud de estos enfermos.

Se distinguen dos tipos de EA según la edad de inicio. Cuando la enfermedad aparece antes de los 65 años se denomina EA de inicio temprano (presenil o familiar); mientras que la forma de EA de inicio tardío (senil o esporádica) se presenta en pacientes mayores de 65 años [2].

1.2 FACTORES DE RIESGO

Además de la edad, que se considera el factor de riesgo más importante para la enfermedad, estudios epidemiológicos han sugerido otros factores asociados como son: bajo nivel educacional y ocupacional, baja habilidad mental durante la juventud y poca actividad física y mental durante la vida adulta, ya que se relaciona con un bajo número de neuronas y ramificaciones sinápticas y dendríticas [7]. Algunos estudios epidemiológicos muestran que el antecedente de traumatismo cráneo-encefálico (TCE) puede ser un factor de riesgo, aunque aún no se encuentra una relación clara [8] y también se ha observado que la incidencia de la enfermedad es mayor en mujeres [Gráfica 1] [9].



Gráfica 1. Muestra que la incidencia de la EA aumenta con la edad y es más frecuente en mujeres [9].

Otros factores de riesgo asociados son las enfermedades vasculares como hipertensión y aterosclerosis, así como hipercolesterolemia, obesidad, diabetes y tabaquismo [7]. Algunas evidencias sugieren que la ingesta de algunas vitaminas como B12, C y E y ácido fólico, así como ácidos grasos insaturados e ingesta moderada de vino tinto pueden reducir el riesgo de la EA [10]. Sin embargo, estos datos se encuentran lejos de ser conclusivos para hacer una generalidad sobre la dieta. Otros factores ambientales como la exposición a metales, pesticidas e infecciones aún se estudian como posibles factores de riesgo [11]. Por otro lado, si bien los factores ambientales pueden incrementar el riesgo de Alzheimer de inicio tardío, también se ha demostrado que la enfermedad tiene una carga importante de factores genéticos [12].

1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

El diagnóstico *in vivo* de la EA se basa en pruebas neurológicas, pruebas neurofisiológicas y psicológicas; así como estudios de gabinete como Tomografía Axial Computarizada (**TAC**) y Resonancia Magnética (**RM**) cerebral [Figura 1]. El grado de confiabilidad de este estudio no es absoluto, ya que únicamente la detección *post mortem* de las características histopatológicas como las placas seniles (**PS**) y las marañas neurofibrilares (**MNF**) permiten el diagnóstico definitivo y la exclusión de otros tipos de demencia [13-15].

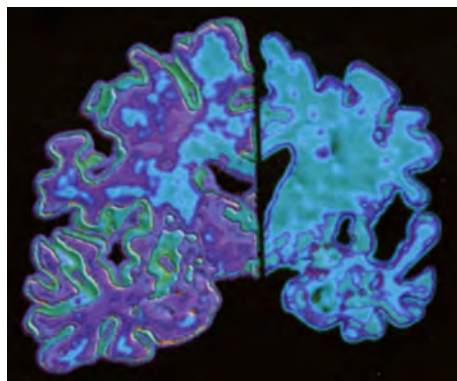


Figura 1. Imagen computarizada de un corte coronal del cerebro normal (izquierda) y del cerebro de un paciente con EA (derecha). Este último está contraído debido a la pérdida neuronal [2].

1.4 HISTOPATOLOGÍA

Los cerebros de los pacientes con EA se caracterizan por la presencia de placas seniles (PS) extracelulares, marañas neurofibrilares (MNF) intracelulares [Figura 2], neuritis distróficas (axones y dendritas) y la activación de células de la glía (microglía y astrocitos), especialmente alrededor de las PS [5], además de una amplia afectación del neurópilo desde estadios muy tempranos de la enfermedad [16]. Estas lesiones se localizan en estructuras del lóbulo medio temporal y áreas corticales del cerebro, donde también se encuentra una degeneración de neuronas y sinapsis [17].

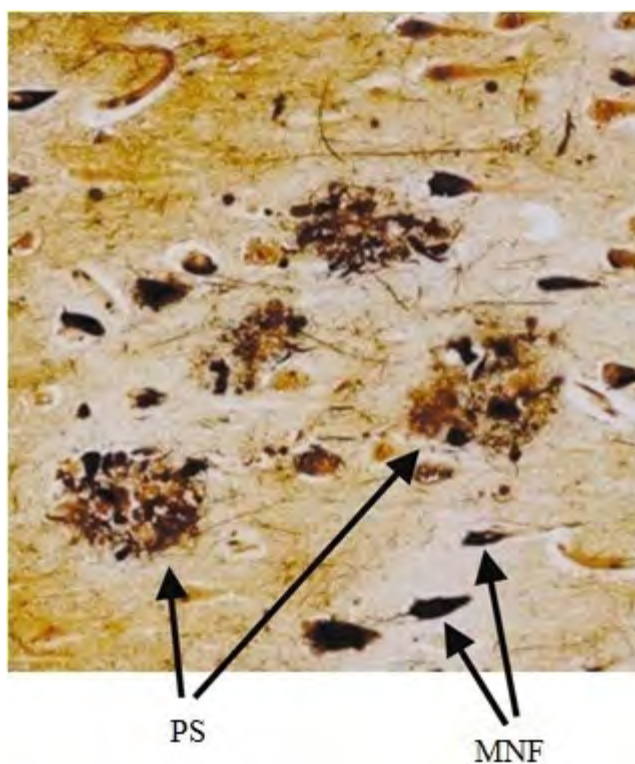


Figura 2. Placas seniles (PS) y marañas neurofibrilares (MNF) presentes en la corteza cerebral de un paciente con la Enfermedad de Alzheimer [17].

Las PS están compuestas principalmente por el péptido Amiloide (A β) y su formación se considera un evento temprano en la patogénesis de la EA. Por otro lado, las MNF son agregados intracelulares, cuyo componente principal es la proteína microtubular Tau fosforilada [18, 19]. Esta proteína en estado fosforilado puede desestabilizar la red de los microtúbulos debido a su incapacidad de unir y promover su ensamblaje, lo que puede

perjudicar tanto el transporte axonal como contribuir a la formación de MNF, con la subsecuente muerte neuronal [20, 21]. Estudios *post mortem* sugieren que las primeras áreas afectadas del cerebro, al menos por las MNF, son el hipocampo y la corteza entorrinal ubicados en el lóbulo temporal [22], en donde las neuronas se pierden selectivamente. A diferencia del depósito de amiloide β , el desarrollo de la patología neurofibrilar sigue un orden progresivo en términos topográficos. Sin embargo, aún no está claro cómo esta progresión pasa de un estado topográfico a otro en sentido temporal [23].

La mayor relación estructural con la disfunción cognitiva en la EA es la disminución de sinapsis en el hipocampo y la corteza, lo que se refleja en la pérdida de pequeñas vesículas sinápticas y muchos péptidos. Eventualmente, se observa una pérdida del 10-20% de las neuronas corticales [24]. Además, ocurre una pérdida neuronal subcortical en los Núcleos Basales de Meynert y en el Locus Coeruleus, resultando en una depleción de marcadores colinérgicos y noradrenérgicos a nivel cortical.. El más profundo y temprano deterioro cognitivo parece ser el de la memoria episódica, es decir, la habilidad para recordar eventos en lugar y tiempo específicos [25]. Al extenderse esta patología, involucra áreas de asociación cortical que originan las deficiencias características en funciones ejecutivas (planeación y ejecución), memoria semántica (reconocimiento de palabras, rostros y objetos) y alteraciones visuo-espaciales [26].

El número de sinapsis es la correlación estructural que mejor se asocia con la gravedad del cuadro clínico, como han demostrado las biopsias de la corteza cerebral [27]. También se ha correlacionado la cuantificación de proteínas sinápticas como la proteína vesicular sinaptofisina [28].

Aunque la mayoría de los estudios realizados a la fecha tratan sobre la agregación y depósito del péptido A β en el desarrollo de las PS y la hiperfosforilación de la proteína Tau en la formación de MNF, también existen estudios sobre la disfunción neurovascular y anomalías del ciclo celular, inflamación, estrés oxidativo y alteraciones mitocondriales [17].

1.5 PLACAS SENILES Y MARAÑAS NEUROFIBRILARES

- Placas seniles (PS)

La correlación entre las PS y la EA se logró cuando Glenner y colaboradores en 1984 purificaron placas seniles para secuenciar y clonar el péptido A β , para posteriormente identificar su secuencia de aminoácidos (aa) [17]. Las PS son lesiones que interrumpen la trayectoria normal de las neuritas y están asociadas con la inflamación y distrófia de dendritas y axones. Estas neuritas distróficas contienen diferentes proteínas como las sinápticas, del citoesqueleto y las relacionadas con plasticidad y crecimiento neuronal [29].

El A β es un fragmento formado de la proteólisis de la glicoproteína transmembranal precursora del amiloide (APP, Amyloid Precursor Protein). Inicialmente el A β fue considerado como una proteína anormal pero posteriormente se observó en el metabolismo normal de la célula [30]. Aunque la APP se encuentra altamente expresada en cerebro y riñón, puede detectarse en varios tejidos en mamíferos y cierto porcentaje se encuentra presente en la superficie de las células del cerebro [31-33].

Estudios *in vitro* indican que la secreción de APP puede actuar como señal autócrina para estimular la proliferación y adhesión celular [34]. A diferencia de la APP que se encuentra en la superficie celular; la cual posee una actividad promotora de neuritas [35], co-localizada con componentes de adhesión [33, 36] y vesículas de reciclaje que participan en la sinapsis [37], lo que sugiere que un porcentaje de APP puede funcionar como receptor en la superficie celular, en transducción de señales desde la matriz extracelular hasta el interior de la célula [31, 38] o en asociación con otras proteínas, en la regulación de la transcripción [39]. Por otro lado, APP también está involucrada en el desarrollo neuronal, sinaptogénesis y plasticidad sináptica [40-42].

- Marañas neurofibrilares (MNF)

Las MNF son lesiones intraneuronales compuestas por una proteína microtubular alterada llamada Tau. Esta proteína se encuentra extremadamente fosforilada, lo que la hace insoluble, formando una estructura filamentosa de doble hélice [43, 44]. Se desconoce el mecanismo mediante el cual la proteína Tau se altera, pero es importante mencionar que personas sanas de edad avanzada pueden desarrollar MNF, aunque éstas se encuentran limitadas al sistema límbico y son relativamente escasas [16]; a diferencia de la EA, en la

cual hay un patrón de expansión de las MNF desde las zonas mediales en dirección al lóbulo temporal y de ahí al resto de la corteza cerebral [45]. Aunque existe una gran variedad de procesos que contribuyen a la muerte neuronal, el depósito intracelular de las proteínas insolubles y su efecto directo en la arquitectura del citoesqueleto es claramente un factor crítico [46]. Sin embargo, resulta interesante que las mutaciones en el gen de la proteína Tau no conducen al desarrollo de la EA [16].

Las MNF se forman debido a la hiperfosforilación de Tau mediante mecanismos que provocan la disociación de los microtúbulos y la formación espontánea de filamentos insolubles. Se han podido inducir marcadores antigénicos de hiperfosforilación de Tau y depósitos limitados de Tau en neuronas *in vitro* mediante tres diferentes vías: aumento de la concentración intracelular de calcio, reducción de la energía disponible y aumento de la concentración de glutamato. Esto parece indicar que las MNF surgen subsecuentemente al estrés neuronal [47].

1.6 METABOLISMO DE LA APP

La APP es una proteína transmembranal con un extremo N-terminal extracelular, un dominio A β que se encuentra embebido en la membrana plasmática y un dominio C-terminal intracelular. La APP puede ser procesada por dos vías [Figura 3]:

1. La vía de la α -secretasa. Esta enzima corta el APP incluyendo el dominio A β resultando un fragmento soluble de APP (APP α s) [17]. Esta molécula tiene efectos positivos sobre las neuronas en cultivos celulares [48]. El fragmento C-terminal remanente (α CTF o C83) es cortado por la γ -secretasa, que da como resultado un pequeño péptido. El residuo del dominio APP intracelular (APP intracellular domain, AICD) es metabolizado en el citoplasma.
2. La vía de la β -secretasa. Esta enzima corta la APP justo antes del dominio A β , resultando un fragmento soluble distinto de APP (APP β s). El remanente β CTF o C99 es cortado por la γ -secretasa que da como resultado un péptido A β libre de 40 o 42 aa El residuo AICD es metabolizado en el citoplasma.

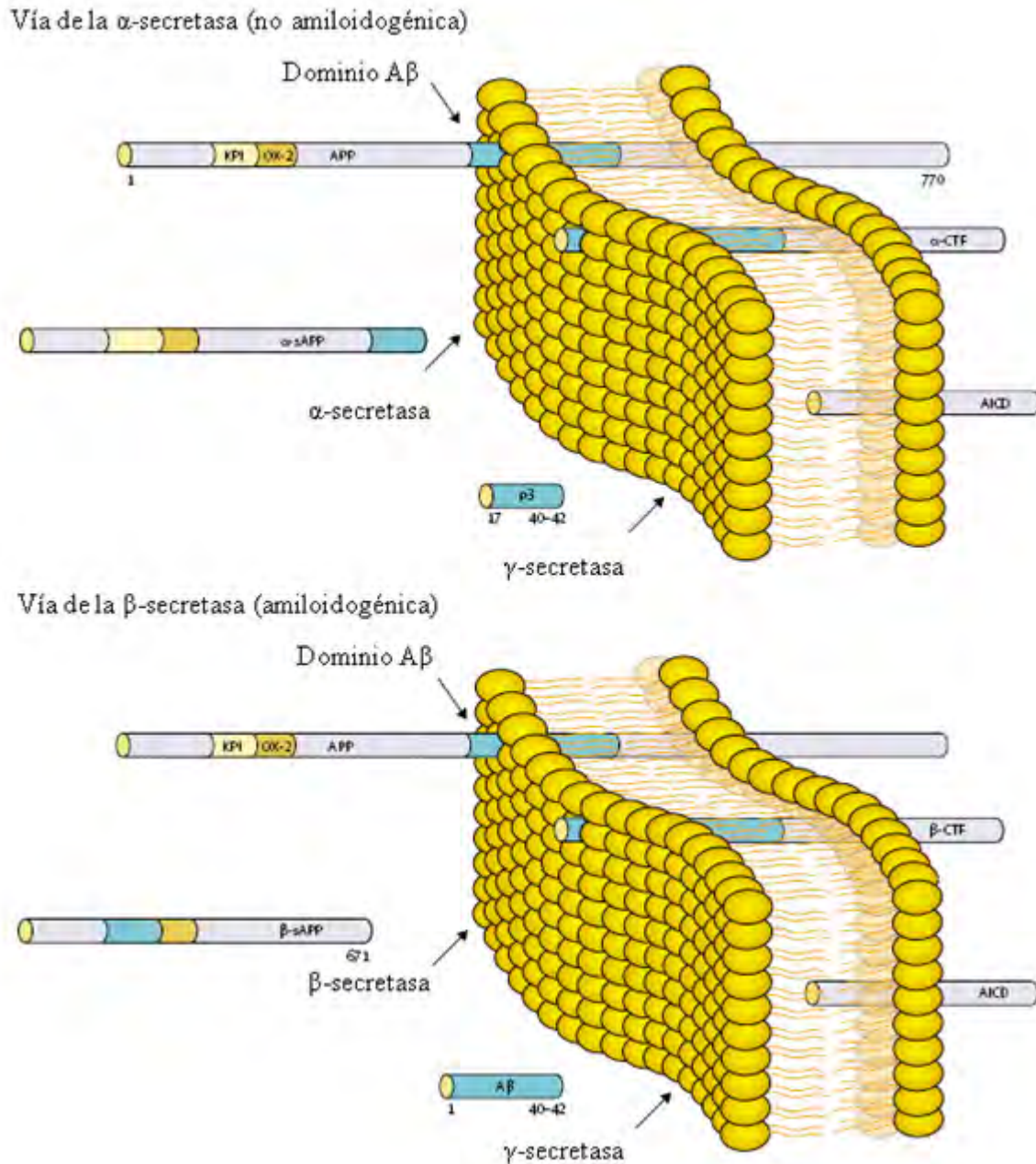


Figura 3. Metabolismo de la APP. La APP se procesa mediante las secretasas α -, β y γ -, las cuales producen APPs y A β 42.

Este péptido puede agregarse y formar PS características de la EA [17].

El procesamiento normal de la molécula APP por la α -secretasa imposibilitaría la generación de cualquiera de los fragmentos β pero en la EA el metabolismo normal de la proteína APP se altera significativamente y se observa que el A β se deposita en cualquiera de sus longitudes de 40-42 aa [49]. Se sugiere que la acumulación inicial es del fragmento

1-42, aunque éste parece no producir una reacción inflamatoria intensa y permanece soluble. Sin embargo, se propone que la acumulación del fragmento 1-40 es la más asociado con las PS maduras [16, 50]. La γ -secretasa parece ser la responsable del origen del péptido $A\beta_{42}$. Este péptido de 42 aa puede formar agregados fibrilares tóxicos insolubles [51, 52]. El péptido 40-43 (fragmento β) de la APP se deposita en el centro de las PS y se encuentra también en las paredes de la red vascular del cerebro [16].

1.7 GENES IMPLICADOS EN LA EA DE INICIO TEMPRANO

La EA de inicio temprano es una patología con herencia autosómica dominante que inicia antes de los 65 años. En estas formas familiares se han observado mutaciones en los genes presenilina 1 (PS1) localizado en el cromosoma 14, presenilina 2 (PS2) en el cromosoma 1 [17, 53] y APP en el cromosoma 21. Sin embargo, este tipo de EA representa menos del 5% de los casos [17, 54].

Se sabe que las presenilinas regulan el procesamiento de APP a través de sus efectos sobre la γ -secretasa, enzima que interviene en el metabolismo de la APP. Tanto las mutaciones PS1 como PS2 elevan los niveles de $A\beta_{1-42}$ en sangre, en el líquido cefalorraquídeo (**LCR**) y en el cerebro de los casos afectados [50, 55], lo que predispone a las neuronas a la muerte celular programada (apoptosis).

1.8 HIPÓTESIS DE LA CASCADA DEL $A\beta$

De acuerdo a la hipótesis de la cascada del $A\beta$, el proceso de desregulación de APP es un evento temprano en la EA resultando en la sobreproducción [56], acumulación y depósito de $A\beta$ para formar las PS en la corteza cerebral y en algunas regiones subcorticales. El $A\beta$ inicia una cascada de eventos: daño neurítico y sináptico, activación de microglía y astrocitos (respuesta inflamatoria), alteración en el equilibrio iónico neural, daño oxidativo, cambios en las actividades de quinasas/fosfatasas y formación de MNF [57]. Todo esto lleva a la muerte celular. Además, se cree que la EA de inicio tardío está relacionada con el medio ambiente, especialmente algunos tipos de estrés como isquemia [58], estrés oxidativo [59] baja energía [60], estrés calórico [61] y daño mecánico [62] [Figura 4].

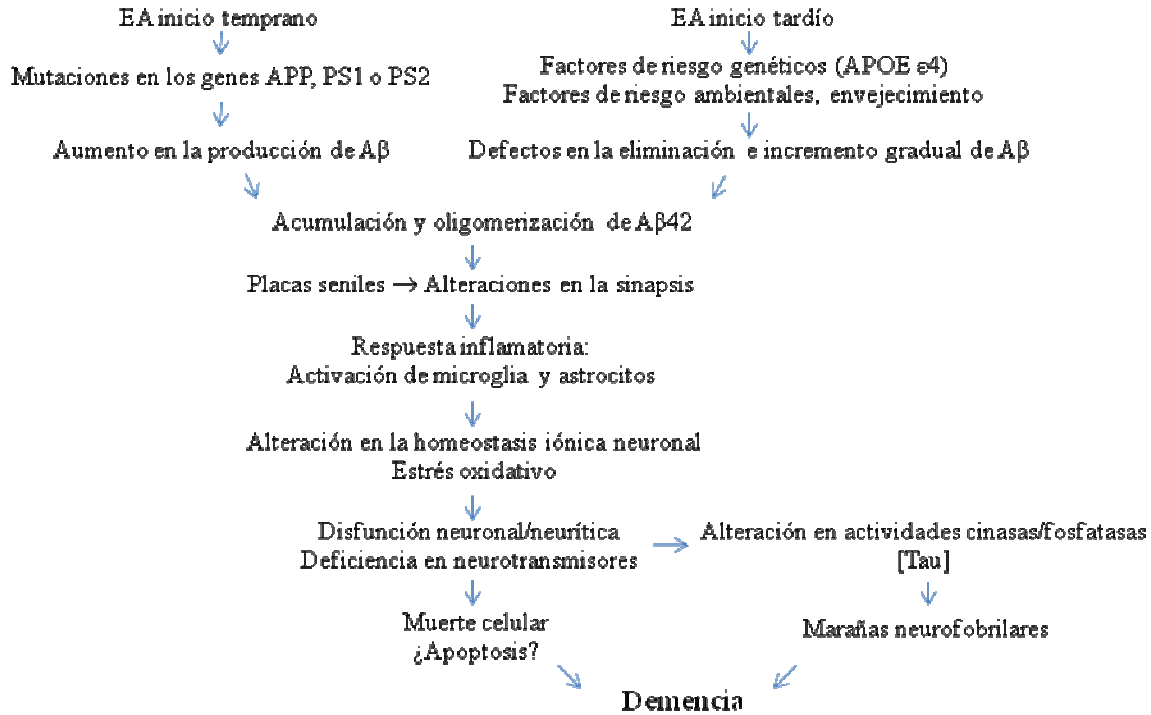


Figura 4. Hipótesis de la cascada amiloide que explica el desarrollo de la EA a partir de la acumulación del péptido amiloide [17, 63].

Sin embargo, existe otra teoría que dice que las PS no son causa de la EA de inicio tardío, sino que la acumulación de péptido A β es una respuesta protectora al daño oxidativo originado por una disfunción mitocondrial. Se ha observado que la densidad de las PS se correlaciona muy poco con la severidad de la demencia, a diferencia de las MNF donde existe correlación entre la cantidad de éstas con el decline en habilidades cognitivas.

Existen dos variantes en el carboxilo terminal de A β : A β_{1-40} es secretado por la mayoría de las especies en cultivo celular y se encuentra en el LCR; mientras que A β_{1-42} es el mayor componente de los depósitos de amiloide [64]. Los niveles del péptido A β_{1-42} en el plasma de pacientes con la EA no han revelado diferencia con respecto a controles, mientras que se observa una reducción de este péptido en el LCR de pacientes comparados con controles [65, 66].

1.9 GENES IMPLICADOS EN LA EA DE INICIO TARDÍO

La apolipoproteína E (ApoE) es una proteína de 34kDa que se sintetiza en el hígado [67]. Ésta funciona en la periferia como un mediador del metabolismo de la lipoproteína a través de la unión de partículas de ApoE del plasma a las membranas de la súper familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (**LBD**). Dentro del sistema nervioso, ApoE es sintetizada y secretada por astrocitos y microglia. Esto es importante, ya que ningún otro tipo de lipoproteínas se encuentran en el cerebro. Se piensa que la ApoE juega un papel importante en la redistribución de lípidos y colesterol durante la reparación membranar y en el transporte de lipoproteínas [68].

En humanos existen comúnmente 3 alelos del gen ApoE: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. En cultivos neuronales, ApoE induce la formación de neuritas y funciona como un antioxidante endógeno [69]. Los receptores de ApoE (expresados en neuronas) se involucran en la migración de poblaciones neuronales. Además, ApoE4 tiene efectos en la fosforilación de la proteína Tau, aunque aún se desconoce con precisión este proceso [70].

Se ha determinado que el alelo 4 de ApoE incrementa 3 veces el riesgo de la enfermedad en heterocigotos y 15 veces en homocigotos y se ha observado que este alelo disminuye la edad de inicio en casi 10 años [17]. Está demostrado que los casos de EA que son portadores del alelo 4 tienen una cantidad mayor de A β y PS que los que no son portadores de este alelo [71, 72] y es posible que la ApoE participe en el proceso de depósito neurofibrilar y de PS [73]. Aunque el alelo 4 de APOE es necesario, no es suficiente para causar la EA [74].

ApoE actúa como un transportador de colesterol en el cerebro y se ha observado que el alelo 4 es menos eficiente que otras variantes para reutilizar lípidos de membrana y en la reparación neuronal. ApoE4 es también esencial para el depósito del A β , promoviendo la formación de MNF posiblemente por la acción de una chaperona patológica.

Es probable que la contribución de otros genes sea menor. Aunque algunos estudios reportan débiles asociaciones con diferentes genes, éstas no han sido verificadas. Una posible explicación para esta dificultad puede ser que la forma esporádica de la enfermedad no es enteramente homogénea y que los genes de susceptibilidad solo confieren un pequeño incremento en el riesgo junto a una compleja interacción con factores ambientales [17].

Recientemente, se encontró evidencia que variantes alélicas en los promotores de ciertos genes pueden ser relevantes en algunas enfermedades por la alteración de actividades transcripcionales. Algunos ejemplos incluyen **polimorfismos** en los promotores de genes relacionados con enfermedades neurológicas como el gen α -sinucleína asociado a la Enfermedad de Parkinson [75] y en APOE que se asocia a riesgo de la EA [76].

1.10 POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs)

En un individuo 99.9% de su secuencia de ADN es idéntica a la de otra persona. Del 0.1% de diferencia, más del 80% son **polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)**. Un SNP es una sustitución de un nucleótido por otro, ambas posibilidades son observadas en general en la población a una frecuencia superior al 1% [perkinelmer.com]. Un SNP se origina de una mutación puntual, por lo que cambia un nucleótido por otro. Si la mutación es en las células reproductoras de un individuo, una o más de sus descendientes podría heredar la mutación y, después de varias generaciones, el SNP podría establecerse en una población determinada. Así que sólo existen dos alelos posibles: el de la secuencia original y el de la versión mutada [77].

Ejemplo: Cuando la secuencia de un individuo A es AGTCAGAAATC mientras que de un individuo B es AGTCACAAATC, el SNP es G/C [Figura 5].

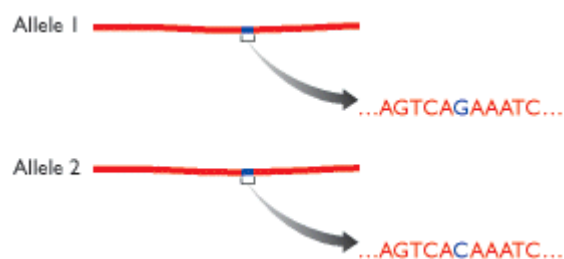


Figura 5. Ejemplo de polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) [78]

Se estima que los SNPs ocurren 1 cada 1,000 pares de bases. Esto implica que existen 3 millones de SNPs entre genomas y cerca de 10 a 30 millones de SNPs potenciales en el genoma humano. Más de 4 millones de SNPs han sido identificados y cerca de 2.6 millones de ellos se encuentran en la base de datos del NCBI que se identifican como rsSNPs.

Muchas enfermedades en humanos son causadas por complejas interacciones entre múltiples genes, factores ambientales y estilo de vida. Factores genéticos confieren susceptibilidad o resistencia a la enfermedad; así como en la severidad o progresión. Estudios de asociación pueden detectar e indicar con que frecuencia están asociados los polimorfismos en los genes que causan la enfermedad. Eventualmente serán establecidos, perfiles de SNPs que son característicos de una variedad de enfermedades, para que después sea posible escanear la susceptibilidad de los individuos a desarrollar una patología sólo analizando su ADN en busca SNPs específicos. Con ello, los SNPs también servirán para los estudios farmacogenómicos [perkinelmer.com].

1.11 ESTUDIO DE LIGAMIENTO Y ASOCIACIÓN

Se han realizado diversos estudios de ligamiento para EA de inicio tardío. El primero lo realizó el grupo de Roses (1991) obteniendo una Puntuación LOD >3.0 para el cromosoma 19 en la región q13.2. Dos años después el mismo grupo de investigación realizó un estudio de asociación con las variantes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) del gen ApoE y obtuvieron una asociación positiva para la variante $\epsilon 4$.

Por otro lado se ha visto que pacientes con Síndrome de Down (**SD**, trisomía 21) desarrollan un depósito temprano de A β en el cerebro [78-80], por lo que se especula que independientemente del alelo $\epsilon 4$ de APOE existen factores de riesgo genéticos relacionados con la EA en el cromosoma 21 [81, 82].

- APP

En el SD existe una copia extra del gen APP, la duplicación de este gen lleva a una sobreexpresión de la APP [83], eleva los niveles de circulación del A β e incrementa el depósito del A β en las PS [84], el cual resulta en una EA de inicio temprano aproximadamente a los 30 años de edad. Estas observaciones ilustran la importancia de la regulación del gen APP en el desarrollo de la EA [85].

Existen reportes acerca de que la duplicación del gen APP es transmitido en pacientes con la EA con angiopatías cerebrales de inicio temprano [86], aunque no ha sido reportada una relación con la duplicación de APP en estudios de caso-control [87, 88].

- **DYRK1A**

El gen DYRK1A (dual specificity tyrosine (Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A) se encuentra en el cromosoma 21 y codifica para una proteína quinasa. Dyrk1A tiene un sustrato dual que se autofosforila en los residuos de tirosina para su propia activación y fosforila sus proteínas blanco en los residuos de serina/treonina (Ser/Thr) [89]. Dyrk1A participa en el desarrollo cerebral y regula las redes dendríticas en las neuronas [90]. Durante este periodo, Dyrk1A se expresa tanto en el núcleo como en el citoplasma de las neuronas [91].

Poco se conoce acerca de la función de Dyrk1A en el cerebro adulto, aunque resulta de interés en diferentes enfermedades neurodegenerativas; ya que Dyrk1 fosforila a la proteína Tau en la posición (Thr), y éste residuo se ha observado fosforilado en estadio fetal e hiperfosforilado en la EA [92]. Esta hiperfosforilación depende de la acción de diversas quinasas y fosfatasas, ya que distintas quinasas activas se expresan en asociación con depósitos de Tau fosforilada en neuronas y células gliales en la EA [93].

La fosforilación de Tau en regiones ricas en prolina induce cambios conformacionales [94], que conducen a los microtúbulos a forman uniones con la proteína hiperfosforilada y la subsecuente formación de agregados. De tal manera que la fosforilación de Tau por Dyrk1A inhibe la capacidad de Tau para promover el ensamblaje de microtúbulos, lo que culmina en la formación de MNF [45]. Esta reducción en la capacidad de Tau para promover el ensamblaje de microtúbulos es proporcional al nivel de fosforilación de Tau [95].

- **RUNX1**

RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) codifica para un factor de transcripción que es requerido para activar la represión en los timocitos CD4-negativos/CD8-negativos. Mutaciones en este gen causa un desorden familiar en las plaquetas con predisposición a leucemia mielógena aguda [96]. El homólogo de RUNX1 en ratones se expresa en algunos tipos de neuronas motoras y sensoriales postmitóticas.

Las proteínas Runx actúan como factores de unión al ADN; que dependiendo del contexto del promotor regulan la activación y represión transcripcional, controlando diferentes vías de desarrollo [97]. Runx1 es sintetizado también por neuronas motoras somáticas en la médula espinal y en neuronas motoras colinérgicas branquiales y viscerales [98]. Una alteración en la función de Runx1 *in vivo* no parece perturbar la generación inicial de estas células pero sí altera su desarrollo postmitótico, resultando en una pérdida de estos tipos de neuronas, lo que sugiere que Runx1 juega un papel importante en la diferenciación postmitótica de algunas neuronas en el Sistema Nervioso Central y Periférico [99].

II. JUSTIFICACIÓN

Actualmente (2009) se estima que en México existen aproximadamente 1 millón 250 mil pacientes con EA. Por ello resulta de gran importancia realizar estudios de los factores de riesgo genético en ésta enfermedad, con el fin de implementar diferentes medidas preventivas y de tratamiento para mejorar la calidad de vida en estos pacientes, Se reconoce que además de ser una tragedia personal y familiar, la EA y otras demencias representan un problema financiero para los servicios de salud.

Uno de los primeros pasos en el estudio de la EA es proponer métodos para el diagnóstico de esta enfermedad *in vivo*, pues actualmente solo es posible dar un diagnóstico preciso *post mortem*. Dado que existen estudios que demuestran una clara asociación entre SNPs y diversas enfermedades, es viable que mediante genotipificación, identificar genotipos de riesgo (GR) para la EA que permitan un diagnóstico de certeza.

Existen algunos estudios sobre SNPs asociados a la EA pero ninguno de ellos en nuestro país; por lo que este proyecto de investigación resulta de gran relevancia para conocer los SNPs que representan un factor de riesgo a desarrollar EA en nuestra población.

III. OBJETIVO GENERAL

Establecer asociación entre los SNPs de los genes APP (rs364048), DYRK1A (rs2835740) y RUNX1 (rs4816501) con la EA de inicio tardío en una muestra de pacientes mexicanos.

Objetivos particulares:

- Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los SNPs rs364048 (gen APP), rs2835740 (gen DYRK1A) y rs4816501 (gen RUNX1) en 68 pacientes con EA de inicio tardío.
- Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los SNPs rs364048 (gen APP), rs2835740 (gen DYRK1A) y rs4816501 (gen RUNX1) en 70 controles sanos.
- Identificar si existe asociación entre los SNPs en los genes APP, DYRK1A y RUNX1 con la EA de inicio tardío.

IV. MATERIAL Y MÉTODO

1. Obtención de muestras de sangre

Las muestras utilizadas en este proyecto fueron obtenidas de tres instituciones: Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán” (INN), Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN) y Hospital General de México (HGM). Todas las personas que accedieron a donar sangre fueron notificadas de los objetivos de este proyecto y firmaron una carta de consentimiento informado que se encuentra en el Anexo A.

A) Pacientes: fueron diagnosticados clínicamente con la Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío de acuerdo a los siguientes criterios de selección:

- Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico clínico de EA de inicio tardío*

Edad ≥ 60 años

Carta firmada de consentimiento informado

*Que cumpla con los criterios de DSM-IV (Anexo B)

- Criterios de exclusión

Aquellos casos en los que no se pueda completar los análisis clínicos y moleculares.

B) Controles: individuos > 60 años que llegaron al hospital por razones ajenas a un diagnóstico de demencia.

Un total de 68 pacientes y 70 controles se les extrajeron alrededor de 4mL de sangre periférica que fue almacenada a 4°C hasta su uso

2. Extracción de ADN genómico (ADNg)

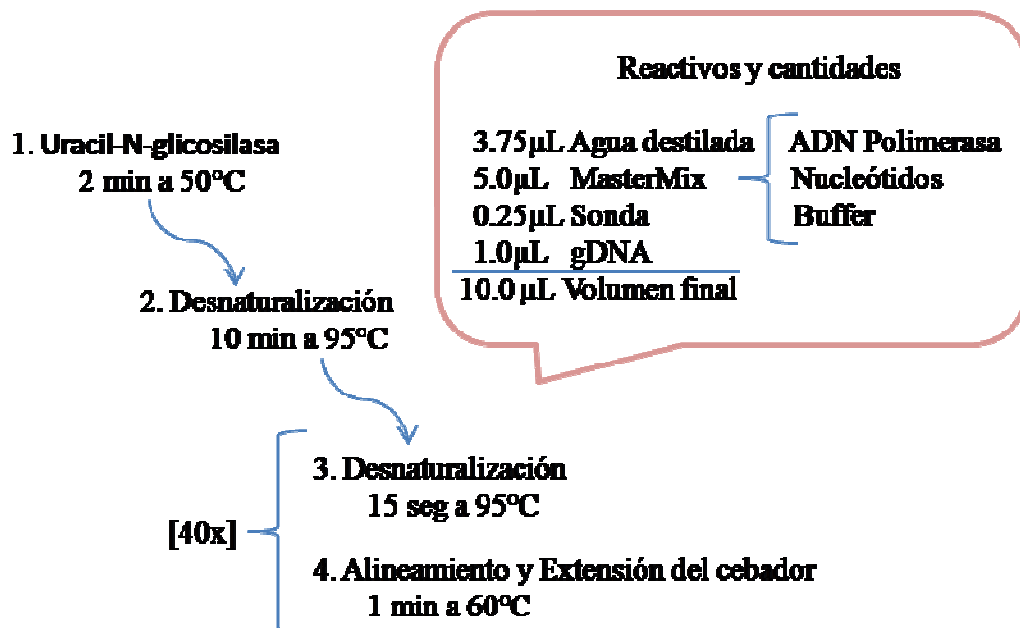
Cada muestra fue procesada para la obtención de ADNg por medio de columnas de afinidad del Kit Versagene para Purificación de ADN Genómico (Gentra Systems). Los detalles técnicos se encuentran en el anexo C.

3. Concentración y pureza de ADNg

Las muestras de ADNg fueron ajustadas a la misma concentración [25ng/μL], mediante lecturas del espectrofotómetro Eppendorf a 260 y 280 nm. Para confirmar la cantidad y determinar la calidad del ADNg extraído, se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

4. PCR-Q, Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

Se realizó una PCR-Q debido a que es una técnica específica, sensible y rápida. Para cada muestra de ADNg con 6 diferentes Sondas Taqman de los distintos alelos que corresponden a los genes APP, DYRK1A y RUNX1 (los alelos de cada uno se muestran en el Anexo D), utilizando un equipo ABI Prism 7000 de Applied Biosystems, con un volumen final de 10 μL y cantidades de la siguiente manera:



Las sondas Taqman usadas en este trabajo tienen dos tipos de reporteros fluorescentes para cada alelo posible de un gen: VIC (V, emisión: 552 nm) y FAC (F, emisión 535 nm). Cuando la PCR-Q se lleva a cabo, una de las sondas se une a la cadena templado de acuerdo a la secuencia y la ADN polimerasa degrada la unión entre V o F (según el caso) y el apagador (Q); de manera que una molécula fluorescente se libera por cada cadena de ADN. Esto nos indica la amplificación que tiene cada alelo [Figura 6].

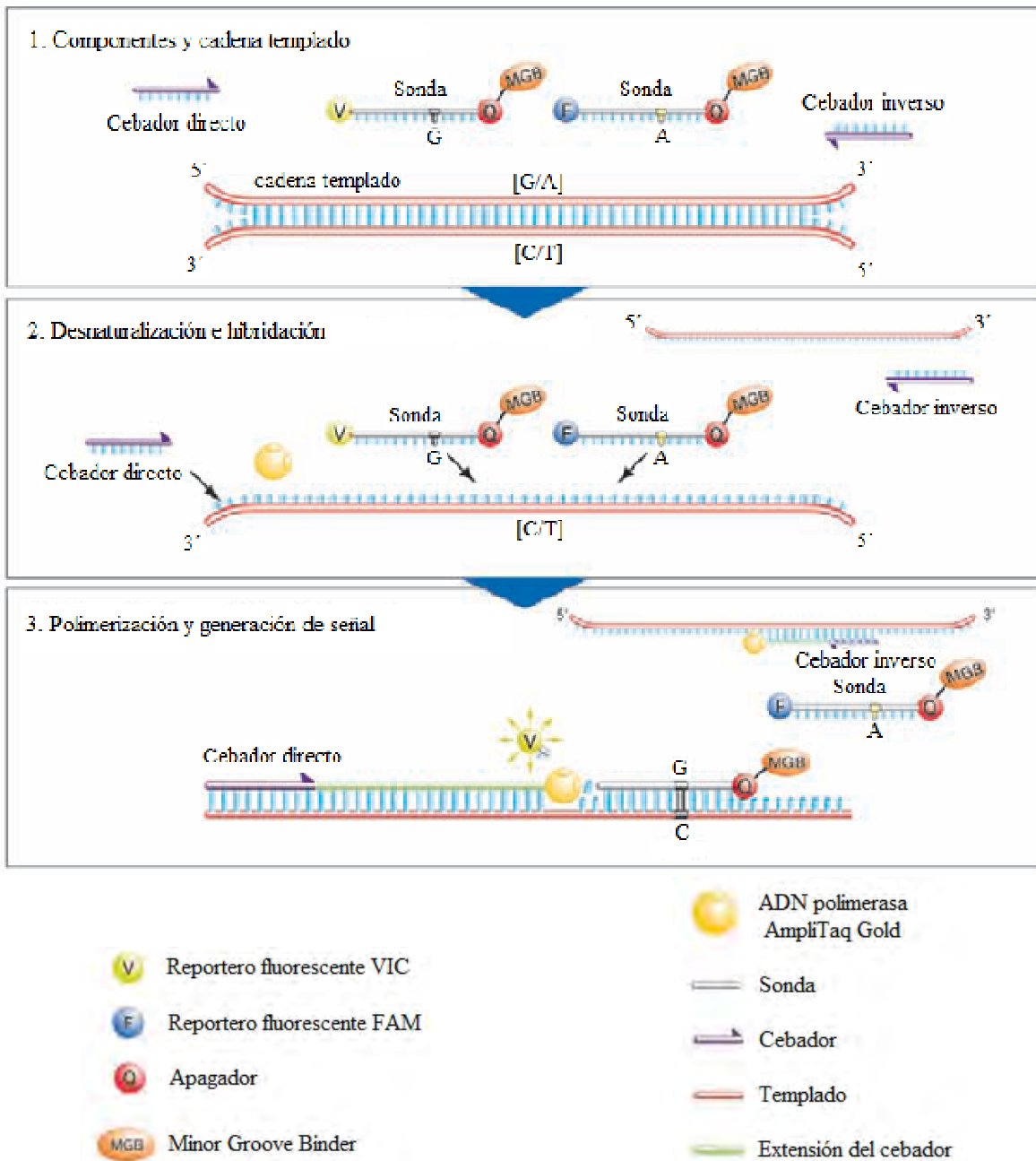


Figura 6. Esquema que representa un ensayo de la técnica de PCR-Q usando el método Taqman [Tomado de Applied Biosystems].

5. Análisis estadístico

La frecuencia genotípica fue calculada para cada gen de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

Donde p = frecuencia del genotipo homocigoto dominante

pq = frecuencia del genotipo heterocigoto

q = frecuencia del genotipo homocigoto recesivo

El análisis estadístico de los datos generados para cada gen consistió en la estimación de la razón de probabilidades u *odds ratio* (OR) que se obtuvo mediante el cociente entre la probabilidad de que una persona desarrolle la EA y la probabilidad de que no la desarrolle; en relación a los SNPs que presenta en los genes APP, DYRK1A y RUNX1. Si el valor de OR es igual o menor que 1.10 ($OR \leq 1.10$) no hay asociación entre la presencia de SNPs y la enfermedad; mientras que un valor mayor a 1.11 ($OR > 1.11$) indica una asociación positiva con la enfermedad.

Con base en estudios previos se consideraron los siguientes GR:

| | | |
|--------|----|----------------------------|
| APP | AA | Lv <i>et al</i> , 2008 |
| DYRK1A | CC | Kimura <i>et al</i> , 2007 |
| RUNX1 | TT | Kimura <i>et al</i> , 2007 |

A continuación se muestra la fórmula para obtener el OR:

$$OR = \frac{FRp(+)/FRp(-)}{FRc(+)/FRc(-)}$$

Donde:

- $FR_p(+)$ es el número de pacientes homocigotos que presentan el factor de riesgo positivo.
- $FR_p(-)$ es la suma de los pacientes homocigotos y heterocigotos que presentan el factor de riesgo negativo.
- $FR_c(+)$ es el número de controles homocigotos que presentan el factor de riesgo positivo.
- $FR_c(-)$ es la suma de los controles homocigotos y heterocigotos que presentan el factor de riesgo negativo.

V. RESULTADOS

* Características de la Poblacion

| | Pacientes | Controles |
|-----------------------|---------------|---------------|
| Sexo femenino: | 41 (60.3) | 43 (61.4) |
| Sexo masculino: | 27 (39.7) | 27 (38.6) |
| Total | 68 | 70 |
| Edad promedio (años): | 75.72 [60-92] | 73.32 [60-92] |

* Identificación de genotipos

La identificación de genotipos se realizó mediante PCR-Q. La cantidad de fluorescencia emitida por las sondas TaqMan fue graficada por el software ABI Prism7000 SDS, lo que permitió la agrupación de los genotipos homocigotos y heterocigotos (Figura 7).

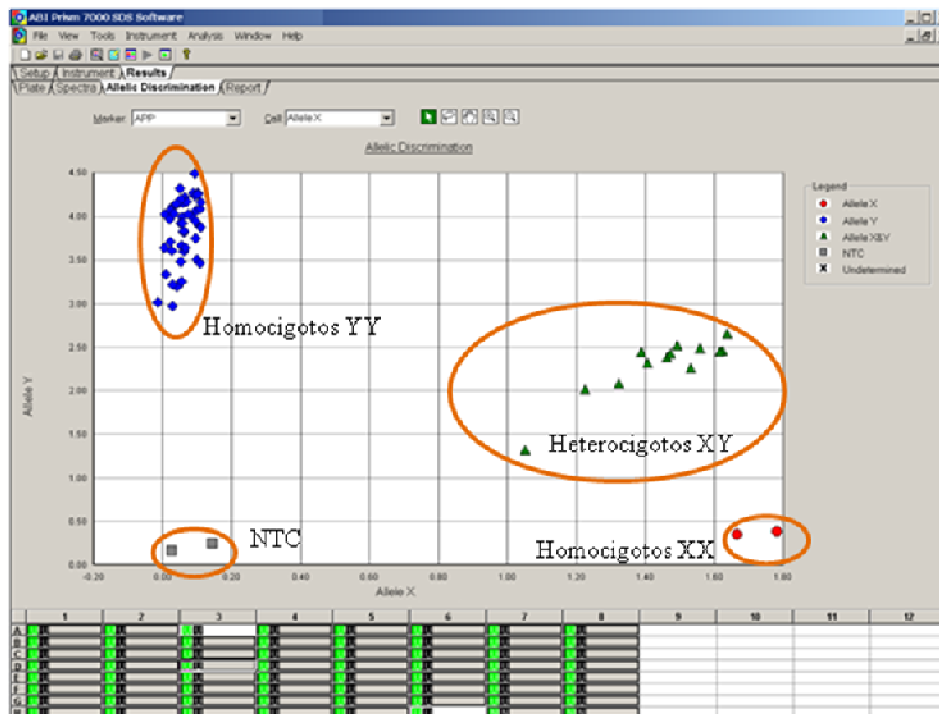


Figura 7. Ejemplo de identificación de genotipos mediante la gráfica de fluorescencia.

* Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para demostrar que la muestra fue tomada aleatoriamente, calculamos las frecuencias genotípicas y encontramos que existe una proporción entre el grupo de pacientes y de controles para cada gen estudiado de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg.

Ejemplo APP:

| | | | | |
|-------------------|--|-------|-------|------|
| | GG | GA | AA | |
| • Pacientes | 2 | 11 | 55 | = 68 |
| | 2/68 | 11/68 | 55/68 | |
| | 0.03 | 0.16 | 0.81 | = 1 |
| $p^2 + 2pq + q^2$ | $(0.03)^2 + 2(0.16) + (0.81)^2 = 0.98$ | | | |
| • Controles | 0 | 20 | 50 | = 70 |
| | 0 | 0.29 | 0.71 | = 1 |
| $p^2 + 2pq + q^2$ | $0 + 2(0.29) + (0.71)^2 = 1.08$ | | | |

Valores del Equilibrio de Hardy-Weinberg:

| Gen | Pacientes | Controles |
|--------|-----------|-----------|
| APP | 0.98 | 1.08 |
| DYRK1A | 1.07 | 1.04 |
| RUNX1 | 0.88 | 1.00 |

* Frecuencia alélica y genotípica

A continuación se muestran los resultados de la PCR-Q, donde se indica la procedencia de cada muestra así como el genotipo asignado para el gen **APP** [tablas 1 y 2]. Y en la tabla 3 se encuentra el cálculo OR.

Tabla 1. Genotipos de pacientes para el gen APP.

Las columnas de alelos indican la señal fluorescente normalizada emitida por la PCR-Q.

| Número de paciente | Número de Muestra | Procedencia | Alelo G | Alelo A | Genotipo |
|--------------------|-------------------|-------------|---------|---------|----------|
| 1 | 1P | HG | 1.689 | 2.374 | GA |
| 2 | 2P | HG | 1.849 | 2.521 | GA |
| 3 | 3P | HG | 0.145 | 4.099 | AA |
| 4 | 4P | HG | 0.086 | 4.577 | AA |
| 5 | 5P | HG | 0.07 | 4.194 | AA |
| 6 | 6P | HG | 0.084 | 5.177 | AA |
| 7 | 7P | HG | 0.088 | 4.675 | AA |
| 8 | 9P | HG | 0.111 | 4.805 | AA |
| 9 | 10P | HG | 0.126 | 4.995 | AA |
| 10 | 11P | HG | 0.069 | 4.881 | AA |
| 11 | 12P | HG | 0.039 | 4.623 | AA |
| 12 | 13P | HG | 0.079 | 5.127 | AA |
| 13 | 14P | HG | 0.028 | 5.43 | AA |
| 14 | 15P | HG | 0.098 | 4.617 | AA |
| 15 | 16P | HG | 0.113 | 4.981 | AA |
| 16 | 17P | HG | 0.055 | 4.854 | AA |
| 17 | 18P | HG | 0.104 | 4.99 | AA |
| 18 | 19P | HG | 0.082 | 5.049 | AA |
| 19 | 20P | HG | 0.092 | 5.143 | AA |
| 20 | 21P | HG | 0.208 | 5.753 | AA |
| 21 | 22P | HG | 0.091 | 3.175 | AA |
| 22 | 23P | HG | 1.456 | 2.739 | GA |
| 23 | 24P | HG | 0.049 | 3.686 | AA |
| 24 | 25P | HG | 0.067 | 1.945 | AA |
| 25 | 26P | HG | 0.145 | 4.366 | AA |
| 26 | 1P | INN | 0.102 | 4.258 | AA |
| 27 | 2P | INN | 0.081 | 4.015 | AA |
| 28 | 3P | INN | 1.323 | 2.078 | GA |
| 29 | 4P | INN | 1.052 | 1.326 | GA |
| 30 | 5P | INN | 0.028 | 3.215 | AA |
| 31 | 6P | INN | 0.07 | 4.176 | AA |
| 32 | 7P | INN | 0.057 | 3.93 | AA |
| 33 | 8P | INN | 0.109 | 4.092 | AA |
| 34 | 9P | INN | 0.092 | 4.497 | AA |
| 35 | 10P | INN | 0.11 | 4.165 | AA |
| 36 | 11P | INN | 0.024 | 4.068 | AA |
| 37 | 12P | INN | 0.053 | 4.197 | AA |
| 38 | 13P | INN | 0.021 | 3.974 | AA |
| 39 | 14P | INN | 0.075 | 4.03 | AA |
| 40 | 15P | INN | 0.026 | 3.605 | AA |
| 41 | 16P | INN | 1.388 | 2.444 | GA |
| 42 | 17P | INN | 0.009 | 3.338 | AA |
| 43 | 18P | INN | 0.05 | 4.328 | AA |
| 44 | 19P | INN | -0.01 | 3.018 | AA |
| 45 | 20P | INN | 0.04 | 4.147 | AA |
| 46 | 21P | INN | 1.637 | 2.661 | GA |
| 47 | 22P | INN | 0.034 | 4.038 | AA |
| 48 | 23P | INN | 1.225 | 2.016 | GA |
| 49 | 24P | INN | 1.665 | 0.351 | GG |
| 50 | 25P | INN | 0.006 | 3.641 | AA |

| | | | | | |
|----|-----|------|-------|-------|----|
| 51 | 26P | INN | 1.78 | 0.387 | GG |
| 52 | 27P | INN | 1.473 | 2.433 | GA |
| 53 | 28P | INN | 0.046 | 3.324 | AA |
| 54 | 29P | INN | 0.1 | 4.658 | AA |
| 55 | 30P | INN | 0.089 | 3.554 | AA |
| 56 | 31P | INN | 0.103 | 3.958 | AA |
| 57 | 32P | INN | 0.092 | 3.24 | AA |
| 58 | 1P | INNN | 0.336 | 1.368 | AA |
| 59 | 2P | INNN | 0.114 | 2.89 | AA |
| 60 | 3P | INNN | 0.057 | 1.212 | AA |
| 61 | 4P | INNN | 0.07 | 2.461 | AA |
| 62 | 5P | INNN | 2.636 | 3.85 | GA |
| 63 | 6P | INNN | 0.048 | 1.797 | AA |
| 64 | 7P | INNN | 0.116 | 2.377 | AA |
| 65 | 8P | INNN | -0 | 1.24 | AA |
| 66 | 9P | INNN | 1.18 | 5.388 | GA |
| 67 | 10P | INNN | 0.005 | 1.275 | AA |
| 68 | 11P | INNN | 0.435 | 1.823 | AA |

Tabla 2. Genotipos de controles para el gen APP.

Las columnas de alelos indican la señal fluorescente normalizada emitida por la PCR-Q.

| Número de paciente | Número de muestra | Procedencia | Alelo G | Alelo A | Genotipo |
|--------------------|-------------------|-------------|---------|---------|----------|
| 1 | 1C | HG | 0.064 | 4.832 | AA |
| 2 | 2C | HG | 2.001 | 3.143 | GA |
| 3 | 3C | HG | 1.795 | 2.499 | GA |
| 4 | 4C | HG | 1.123 | 1.377 | GA |
| 5 | 5C | HG | 0.008 | 4.488 | AA |
| 6 | 6C | HG | 0.087 | 5.068 | AA |
| 7 | 7C | HG | 0.102 | 5.178 | AA |
| 8 | 8C | HG | 0.092 | 5.032 | AA |
| 9 | 9C | HG | 0.064 | 5.229 | AA |
| 10 | 10C | HG | 0.205 | 4.376 | AA |
| 11 | 11C | HG | 0.031 | 4.75 | AA |
| 12 | 12C | HG | 0.115 | 5.032 | AA |
| 13 | 13C | HG | 0.022 | 4.709 | AA |
| 14 | 14C | HG | 0.084 | 5.141 | AA |
| 15 | 15C | HG | 0.138 | 3.981 | AA |
| 16 | 16C | HG | 0.453 | 4.601 | AA |
| 17 | 17C | HG | 0.09 | 1.288 | AA |
| 18 | 18C | HG | 0.154 | 2.619 | AA |
| 19 | 19C | HG | 0.133 | 3.813 | AA |
| 20 | 1C | INN | 0.055 | 3.253 | AA |
| 21 | 2C | INN | 0.1 | 3.507 | AA |
| 22 | 3C | INN | 1.611 | 2.411 | GA |
| 23 | 4C | INN | 0.111 | 3.875 | AA |
| 24 | 5C | INN | 0.062 | 3.599 | AA |
| 25 | 6C | INN | 0.06 | 3.82 | AA |
| 26 | 7C | INN | 0.108 | 3.462 | AA |
| 27 | 8C | INN | 1.531 | 2.263 | GA |
| 28 | 9C | INN | 0.055 | 3.664 | AA |
| 29 | 10C | INN | 0.095 | 3.944 | AA |
| 30 | 11C | INN | 1.624 | 2.46 | GA |

| | | | | | |
|----|-----|------|--------|-------|----|
| 31 | 12C | INN | 0.097 | 4.07 | AA |
| 32 | 13C | INN | 0.008 | 4.032 | AA |
| 33 | 14C | INN | 0.061 | 3.834 | AA |
| 34 | 15C | INN | 0.064 | 4.221 | AA |
| 35 | 16C | INN | 0.056 | 3.999 | AA |
| 36 | 17C | INN | 0.041 | 3.191 | AA |
| 37 | 18C | INN | 1.558 | 2.485 | GA |
| 38 | 19C | INN | 0.092 | 4.239 | AA |
| 39 | 20C | INN | 0.029 | 2.971 | AA |
| 40 | 21C | INN | 0.043 | 4.145 | AA |
| 41 | 22C | INN | 0.023 | 3.707 | AA |
| 42 | 23C | INN | 1.463 | 2.384 | GA |
| 43 | 24C | INN | 0.065 | 3.642 | AA |
| 44 | 25C | INN | 0.053 | 3.927 | AA |
| 45 | 26C | INN | 0.058 | 4.156 | AA |
| 46 | 27C | INN | 0.053 | 3.479 | AA |
| 47 | 28C | INN | 1.615 | 2.453 | GA |
| 48 | 29C | INN | 1.492 | 2.526 | GA |
| 49 | 30C | INN | 0.028 | 4.118 | AA |
| 50 | 31C | INN | 0.09 | 4.274 | AA |
| 51 | 32C | INN | 0.101 | 4.277 | AA |
| 52 | 33C | INN | 0.094 | 3.754 | AA |
| 53 | 34C | INN | 1.406 | 2.32 | GA |
| 54 | 3C | INNN | 0.72 | 1.312 | GA |
| 55 | 4C | INNN | 0.08 | 3.503 | AA |
| 56 | 5C | INNN | 0.005 | 2.77 | AA |
| 57 | 6C | INNN | 1.268 | 1.865 | GA |
| 58 | 7C | INNN | 1.274 | 2 | GA |
| 59 | 25C | INNN | 0.081 | 3.115 | AA |
| 60 | 31C | INNN | 0.049 | 3.328 | AA |
| 61 | 32C | INNN | 1.007 | 1.188 | GA |
| 62 | 33C | INNN | -0.013 | 2.531 | AA |
| 63 | 35C | INNN | 0.033 | 3.088 | AA |
| 64 | 36C | INNN | 1.293 | 1.87 | GA |
| 65 | 37C | INNN | 1.43 | 2.051 | GA |
| 66 | 38C | INNN | 0.097 | 3.114 | AA |
| 67 | 40C | INNN | 1.347 | 2.025 | GA |
| 68 | 41C | INNN | 0.999 | 1.211 | GA |
| 69 | 42C | INNN | -0.059 | 2.712 | AA |
| 70 | 44C | INNN | 0.928 | 1.021 | GA |

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y cálculo OR del gen APP.

| | GG | GA | AA |
|-----------|----------|-----------|-----------|
| Pacientes | 2 (0.03) | 11 (0.16) | 55 (0.81) |
| Controles | 0 | 20 (0.29) | 50 (0.71) |

| | Pacientes | Controles |
|----------------------|-----------|-----------|
| Factor de Riesgo (+) | 55 | 50 |
| Factor de Riesgo (-) | 13 | 20 |

OR = 1.69

En las tablas 4 y 5 se encuentran los resultados de la PCR-Q con la procedencia de cada muestra y el genotipo asignado para el gen **DYRK1A** y en la tabla 6 se encuentra el OR calculado.

Tabla 4. Genotipos de pacientes para el gen DYRK1A.

Las columnas de alelos indican la señal fluorescente normalizada emitida por la PCR-Q.

| Número de paciente | Número de muestra | Procedencia | Alelo C | Alelo T | Genotipo |
|--------------------|-------------------|-------------|---------|---------|----------|
| 1 | 1P | HG | 0.152 | 1.224 | TT |
| 2 | 2P | HG | 1.465 | 0.992 | CT |
| 3 | 3P | HG | 0.936 | 0.643 | CT |
| 4 | 4P | HG | 1.151 | 0.908 | CT |
| 5 | 5P | HG | 0.104 | 1.73 | TT |
| 6 | 6P | HG | 0.1 | 0.962 | TT |
| 7 | 7P | HG | 0.136 | 0.81 | TT |
| 8 | 9P | HG | 0.09 | 1.644 | TT |
| 9 | 10P | HG | -0.011 | 1.024 | TT |
| 10 | 11P | HG | 0.794 | 0.662 | CT |
| 11 | 12P | HG | 0.09 | 2.031 | TT |
| 12 | 13P | HG | 1.904 | 1.175 | CT |
| 13 | 14P | HG | 1.108 | 0.966 | CT |
| 14 | 15P | HG | 1.011 | 1.024 | CT |
| 15 | 16P | HG | 0.025 | 1.047 | TT |
| 16 | 17P | HG | 0.046 | 1.529 | TT |
| 17 | 18P | HG | -0.035 | 2.132 | TT |
| 18 | 19P | HG | 0.735 | 0.537 | CT |
| 19 | 20P | HG | 0.081 | 1.836 | TT |
| 20 | 21P | HG | 0.786 | 0.68 | CT |
| 21 | 22P | HG | 0.061 | 2.343 | TT |
| 22 | 23P | HG | 1.223 | 1.239 | CT |
| 23 | 24P | HG | 1.105 | 1.023 | CT |
| 24 | 25P | HG | 0.073 | 2.119 | TT |
| 25 | 26P | HG | 0.125 | 1.88 | TT |
| 26 | 1P | INN | 1.018 | 0.926 | CT |
| 27 | 2P | INN | 1.559 | 1.775 | CC |
| 28 | 3P | INN | 0.059 | 1.913 | TT |
| 29 | 4P | INN | 0.054 | 1.954 | TT |
| 30 | 5P | INN | 0.985 | 0.955 | CT |
| 31 | 6P | INN | 0.066 | 1.961 | TT |
| 32 | 7P | INN | 0.055 | 1.826 | TT |
| 33 | 8P | INN | 0.174 | 3.557 | TT |
| 34 | 9P | INN | 0.07 | 1.927 | TT |
| 35 | 10P | INN | 0.89 | 0.854 | CT |
| 36 | 11P | INN | 1.011 | 1.015 | CT |
| 37 | 12P | INN | 0.065 | 1.901 | TT |
| 38 | 13P | INN | 0.084 | 1.746 | TT |
| 39 | 14P | INN | 1.05 | 0.988 | CT |
| 40 | 15P | INN | 0.053 | 1.783 | TT |
| 41 | 16P | INN | 0.076 | 1.716 | TT |
| 42 | 17P | INN | 0.07 | 1.86 | TT |
| 43 | 18P | INN | 0.082 | 1.794 | TT |

| | | | | | |
|----|-----|------|-------|-------|----|
| 44 | 19P | INN | 0.059 | 2.223 | TT |
| 45 | 20P | INN | 0.056 | 2.136 | TT |
| 46 | 21P | INN | 0.046 | 2.085 | TT |
| 47 | 22P | INN | 0.074 | 2.024 | TT |
| 48 | 23P | INN | 0.048 | 1.331 | TT |
| 49 | 24P | INN | 0.053 | 1.693 | TT |
| 50 | 25P | INN | 0.044 | 2.045 | TT |
| 51 | 26P | INN | 1.037 | 0.427 | CC |
| 52 | 27P | INN | 1.052 | 0.833 | CT |
| 53 | 28P | INN | 0.053 | 0.881 | TT |
| 54 | 29P | INN | 0.06 | 1.914 | TT |
| 55 | 30P | INN | 0.111 | 1.925 | TT |
| 56 | 31P | INN | 0.07 | 1.632 | TT |
| 57 | 32P | INN | 0.559 | 0.916 | CT |
| 58 | 1P | INNN | 0.154 | 1.408 | TT |
| 59 | 2P | INNN | 3.427 | 5.267 | CT |
| 60 | 3P | INNN | 4.155 | 5.369 | CT |
| 61 | 4P | INNN | 0.122 | 1.076 | TT |
| 62 | 5P | INNN | 3.384 | 4.37 | CT |
| 63 | 6P | INNN | 3.801 | 1.837 | CT |
| 64 | 7P | INNN | 0.724 | 8.618 | TT |
| 65 | 8P | INNN | 0.397 | 6.799 | TT |
| 66 | 9P | INNN | 2.519 | 4.082 | CT |
| 67 | 10P | INNN | 0.533 | 8.244 | TT |
| 68 | 11P | INNN | 1.551 | 2.656 | CT |

Tabla 5. Genotipos de controles para el gen DYRK1A.

Las columnas de alelos indican la señal fluorescente normalizada emitida por la PCR-Q.

| Número de Paciente | Número de muestra | Procedencia | Alelo C | Alelo T | Genotipo |
|--------------------|-------------------|-------------|---------|---------|----------|
| 1 | 1C | HG | 0.083 | 1.631 | TT |
| 2 | 2C | HG | 0.047 | 3.069 | TT |
| 3 | 3C | HG | 0.773 | 0.638 | CT |
| 4 | 4C | HG | 0.135 | 1.809 | TT |
| 5 | 5C | HG | 0.022 | 1.743 | TT |
| 6 | 6C | HG | 0.724 | 0.507 | CT |
| 7 | 7C | HG | 1.124 | 1.086 | CT |
| 8 | 8C | HG | 1.405 | 0.967 | CT |
| 9 | 9C | HG | 0.182 | 3.146 | TT |
| 10 | 10C | HG | 0.077 | 1.597 | TT |
| 11 | 11C | HG | 0.537 | 0.374 | CT |
| 12 | 12C | HG | 0.159 | 3.392 | TT |
| 13 | 13C | HG | 1.032 | 0.907 | CT |
| 14 | 14C | HG | 0.105 | 1.875 | TT |
| 15 | 15C | HG | 0.104 | 1.744 | TT |
| 16 | 16C | HG | 1.251 | 1.232 | CT |
| 17 | 17C | HG | 0.08 | 1.988 | TT |
| 18 | 18C | HG | 0.633 | 0.605 | CT |
| 19 | 19C | HG | 1.368 | 0.554 | CC |
| 20 | 1C | INN | 0.723 | 0.609 | CT |
| 21 | 2C | INN | 0.869 | 0.786 | CT |
| 22 | 3C | INN | 0.942 | 0.84 | CT |
| 23 | 4C | INN | 0.054 | 1.805 | TT |
| 24 | 5C | INN | 0.043 | 1.939 | TT |

| | | | | | |
|----|-----|------|-------|-------|----|
| 25 | 6C | INN | 0.057 | 1.679 | TT |
| 26 | 7C | INN | 0.05 | 1.962 | TT |
| 27 | 8C | INN | 0.947 | 0.72 | CT |
| 28 | 9C | INN | 1.017 | 1.065 | CT |
| 29 | 10C | INN | 0.7 | 0.56 | CT |
| 30 | 11C | INN | 0.074 | 1.708 | TT |
| 31 | 12C | INN | 0.917 | 0.977 | CT |
| 32 | 13C | INN | 0.08 | 1.648 | TT |
| 33 | 14C | INN | 0.103 | 1.473 | TT |
| 34 | 15C | INN | 0.088 | 2.141 | TT |
| 35 | 16C | INN | 0.095 | 1.95 | TT |
| 36 | 17C | INN | 0.082 | 1.433 | TT |
| 37 | 18C | INN | 1.001 | 0.904 | CT |
| 38 | 19C | INN | 0.066 | 1.796 | TT |
| 39 | 20C | INN | 0.114 | 1.533 | TT |
| 40 | 21C | INN | 0.097 | 1.717 | TT |
| 41 | 22C | INN | 0.063 | 1.856 | TT |
| 42 | 23C | INN | 0.097 | 1.732 | TT |
| 43 | 24C | INN | 0.91 | 1.372 | CT |
| 44 | 25C | INN | 1.037 | 0.85 | CT |
| 45 | 26C | INN | 0.122 | 1.824 | TT |
| 46 | 27C | INN | 1.219 | 1.088 | CT |
| 47 | 28C | INN | 0.962 | 0.935 | CT |
| 48 | 29C | INN | 0.122 | 2.027 | TT |
| 49 | 30C | INN | 0.1 | 2.103 | TT |
| 50 | 31C | INN | 0.069 | 2.361 | TT |
| 51 | 32C | INN | 0.104 | 2.07 | TT |
| 52 | 33C | INN | 0.064 | 2.027 | TT |
| 53 | 34C | INN | 0.036 | 1.994 | TT |
| 54 | 3C | INNN | 0.098 | 2.431 | TT |
| 55 | 4C | INNN | 0.129 | 2.795 | TT |
| 56 | 5C | INNN | 0.091 | 0.517 | TT |
| 57 | 6C | INNN | 0.825 | 0.465 | CC |
| 58 | 7C | INNN | 1.75 | 0.641 | CT |
| 59 | 25C | INNN | 0.071 | 1.979 | TT |
| 60 | 31C | INNN | 0.944 | 0.505 | CT |
| 61 | 32C | INNN | 0.072 | 1.624 | TT |
| 62 | 33C | INNN | 0.093 | 1.193 | TT |
| 63 | 35C | INNN | 1.139 | 0.642 | CT |
| 64 | 36C | INNN | 0.123 | 0.73 | TT |
| 65 | 37C | INNN | 0.047 | 0.761 | TT |
| 66 | 38C | INNN | 0.128 | 2.851 | TT |
| 67 | 40C | INNN | 0.097 | 2.356 | TT |
| 68 | 41C | INNN | 0.088 | 2.752 | TT |
| 69 | 42C | INNN | 0.047 | 1.585 | TT |
| 70 | 44C | INNN | 0.067 | 1.193 | TT |

Tabla 6. Frecuencias genotípicas y OR del gen DYRK1A.

| | CC | CT | TT |
|-----------|----------|-----------|-----------|
| Pacientes | 2 (0.03) | 24 (0.35) | 42 (0.62) |
| Controles | 2 (0.03) | 23 (0.33) | 45 (0.64) |

| | Pacientes | Controles |
|----------------------|-----------|-----------|
| Factor de Riesgo (+) | 2 | 2 |
| Factor de Riesgo (-) | 66 | 68 |

OR = 1.03

Las siguientes tablas [7 y 8] presentan los resultados de la PCR-Q indicando la procedencia de las muestras y el genotipo que les fue asignado para el gen **RUNX1**. Además, la tabla 9 contiene el OR calculado.

Tabla 7. Genotipos de pacientes para el gen RUNX1.

Las columnas de alelos indican la señal fluorescente normalizada emitida por la PCR-Q.

| Número de Paciente | Número de Muestra | Procedencia | Alelo C | Alelo T | Genotipo |
|--------------------|-------------------|-------------|---------|---------|----------|
| 1 | 1P | HG | 0.987 | 0.063 | CC |
| 2 | 2P | HG | 0.988 | -0.014 | CC |
| 3 | 3P | HG | 1.255 | 0.165 | CC |
| 4 | 4P | HG | 1.099 | 0.034 | CC |
| 5 | 5P | HG | 0.019 | 1.66 | TT |
| 6 | 6P | HG | 0.991 | 0.048 | CC |
| 7 | 7P | HG | -0.107 | 4.413 | TT |
| 8 | 9P | HG | 0.536 | 2.709 | CT |
| 9 | 10P | HG | 0.885 | 0.074 | CC |
| 10 | 11P | HG | 0.967 | -0.059 | CC |
| 11 | 12P | HG | 0.451 | 1.372 | TT |
| 12 | 13P | HG | 0.6 | 1.974 | CT |
| 13 | 14P | HG | 0.923 | 0.008 | CC |
| 14 | 15P | HG | 0.841 | -0.062 | CC |
| 15 | 16P | HG | 0.55 | 1.925 | CT |
| 16 | 17P | HG | 0.719 | 2.914 | CT |
| 17 | 18P | HG | 1.222 | 0.135 | CC |
| 18 | 19P | HG | 0.666 | 2.484 | CT |
| 19 | 20P | HG | 0.958 | 0.071 | CC |
| 20 | 21P | HG | 1.068 | 0.158 | CC |
| 21 | 22P | HG | 0.854 | 0.109 | CC |
| 22 | 23P | HG | 0.99 | 0.033 | CC |
| 23 | 24P | HG | 0.563 | -0.047 | CC |
| 24 | 25P | HG | 0.9 | 0.253 | CC |
| 25 | 26P | HG | 0.877 | 3.8 | TT |
| 26 | 1P | INN | 1.368 | 0.184 | CC |
| 27 | 2P | INN | 0.392 | 1.009 | TT |

| | | | | | |
|----|-----|------|-------|--------|----|
| 28 | 3P | INN | 1.284 | 0.083 | CC |
| 29 | 4P | INN | 0.846 | -0.107 | CC |
| 30 | 5P | INN | 0.49 | 1.157 | CT |
| 31 | 6P | INN | 1.014 | 0.004 | CC |
| 32 | 7P | INN | 1.038 | -0.156 | CC |
| 33 | 8P | INN | 1.014 | 0.294 | CC |
| 34 | 9P | INN | 0.57 | 1.131 | CT |
| 35 | 10P | INN | 0.943 | 0.305 | CC |
| 36 | 11P | INN | 0.789 | -0.071 | CC |
| 37 | 12P | INN | 0.397 | 0.639 | TT |
| 38 | 13P | INN | 0.725 | -0.1 | CC |
| 39 | 14P | INN | 0.669 | -0.113 | CC |
| 40 | 15P | INN | 0.712 | -0.076 | CC |
| 41 | 16P | INN | 0.859 | -0.124 | CC |
| 42 | 17P | INN | 0.434 | 0.837 | TT |
| 43 | 18P | INN | 0.41 | 0.859 | TT |
| 44 | 19P | INN | 1 | -0.047 | CC |
| 45 | 20P | INN | 0.533 | 1.163 | CT |
| 46 | 21P | INN | 0.681 | -0.077 | CC |
| 47 | 22P | INN | 0.569 | -0.086 | CC |
| 48 | 23P | INN | 0.617 | 1.68 | CT |
| 49 | 24P | INN | 0.9 | -0.164 | CC |
| 50 | 25P | INN | 0.879 | -0.15 | CC |
| 51 | 26P | INN | 0.749 | -0.114 | CC |
| 52 | 27P | INN | 0.915 | -0.123 | CC |
| 53 | 28P | INN | 0.37 | 1.239 | TT |
| 54 | 29P | INN | 0.808 | -0.044 | CC |
| 55 | 30P | INN | 1.135 | 0.143 | CC |
| 56 | 31P | INN | 1.311 | 0.226 | CC |
| 57 | 32P | INN | 0.897 | 0.164 | CC |
| 58 | 1P | INNN | 0.048 | 4.741 | TT |
| 59 | 2P | INNN | 0.835 | 3.386 | TT |
| 60 | 3P | INNN | 2.112 | 0.664 | CC |
| 61 | 4P | INNN | 1.329 | 0.151 | CC |
| 62 | 5P | INNN | 0.524 | 2.292 | TT |
| 63 | 6P | INNN | 0.057 | 2.862 | TT |
| 64 | 7P | INNN | 1.153 | 0.227 | CC |
| 65 | 8P | INNN | 2.452 | 0.417 | CC |
| 66 | 9P | INNN | 2.305 | 1.011 | CC |
| 67 | 10P | INNN | 0.639 | 2.504 | TT |
| 68 | 11P | INNN | 2.089 | 0.905 | CC |

Tabla 8. Genotipos de controles para el gen RUNX1.

Las columnas de alelos indican la señal fluorescente normalizada emitida por la PCR-Q.

| Número de paciente | Número de Muestra | Procedencia | Alelo C | Alelo T | Genotipo |
|--------------------|-------------------|-------------|---------|---------|----------|
| 1 | 1C | HG | 0.857 | -0.039 | CC |
| 2 | 2C | HG | 1.406 | 0.141 | CC |
| 3 | 3C | HG | 1.266 | 0.086 | CC |
| 4 | 4C | HG | 1.19 | 0.079 | CC |
| 5 | 5C | HG | 1.079 | 0.037 | CC |
| 6 | 6C | HG | 1.353 | 0.14 | CC |
| 7 | 7C | HG | 1.249 | 0.109 | CC |
| 8 | 8C | HG | 1.085 | 0.161 | CC |

| | | | | | |
|----|-----|------|--------|--------|----|
| 9 | 9C | HG | 0.654 | 2.359 | CT |
| 10 | 10C | HG | 1.256 | 0.269 | CC |
| 11 | 11C | HG | 0.693 | 2.408 | CT |
| 12 | 12C | HG | 1.152 | 0.06 | CC |
| 13 | 13C | HG | 1.08 | -0.035 | CC |
| 14 | 14C | HG | 0.901 | 0.062 | CC |
| 15 | 15C | HG | 0.607 | 2.143 | CT |
| 16 | 16C | HG | 1.029 | 0.365 | CC |
| 17 | 17C | HG | 0.327 | 2.391 | CT |
| 18 | 18C | HG | 1.021 | 0.365 | CC |
| 19 | 19C | HG | 1.344 | 0.224 | CC |
| 20 | 1C | INN | 0.677 | 0.138 | CC |
| 21 | 2C | INN | 0.6 | 3.038 | CT |
| 22 | 3C | INN | 0.896 | 0.132 | CC |
| 23 | 4C | INN | 1.075 | 0.235 | CC |
| 24 | 5C | INN | 0.841 | 0.161 | CC |
| 25 | 6C | INN | 0.504 | 1.676 | CT |
| 26 | 7C | INN | 0.596 | 2.123 | CT |
| 27 | 8C | INN | 1.229 | 0.145 | CC |
| 28 | 9C | INN | 0.508 | 1.761 | CT |
| 29 | 10C | INN | 1.224 | 0.31 | CC |
| 30 | 11C | INN | 0.978 | 0.236 | CC |
| 31 | 12C | INN | 0.658 | 2.476 | CT |
| 32 | 13C | INN | 0.951 | 0.206 | CC |
| 33 | 14C | INN | 0.744 | 0.153 | CC |
| 34 | 15C | INN | 1.123 | 0.155 | CC |
| 35 | 16C | INN | 1.314 | 0.083 | CC |
| 36 | 17C | INN | 0.856 | 0.196 | CC |
| 37 | 18C | INN | 1.368 | 0.16 | CC |
| 38 | 19C | INN | 0.599 | 2.049 | CT |
| 39 | 20C | INN | 0.485 | 0.209 | CC |
| 40 | 21C | INN | 1.312 | 0.236 | CC |
| 41 | 22C | INN | 1.35 | 0.193 | CC |
| 42 | 23C | INN | 0.552 | 1.766 | CT |
| 43 | 24C | INN | 0.691 | 2.985 | CT |
| 44 | 25C | INN | 0.664 | 2.774 | CT |
| 45 | 26C | INN | 1.323 | -0.018 | CC |
| 46 | 27C | INN | 0.644 | 0.684 | CT |
| 47 | 28C | INN | 0.697 | 3.415 | CT |
| 48 | 29C | INN | 0.861 | -0.043 | CC |
| 49 | 30C | INN | 0.588 | 1.373 | CT |
| 50 | 31C | INN | 0.896 | 0.298 | CC |
| 51 | 32C | INN | 1.18 | 0.264 | CC |
| 52 | 33C | INN | 1.226 | 0.19 | CC |
| 53 | 34C | INN | 1.149 | 0.139 | CC |
| 54 | 3C | INNN | -0.124 | 4.556 | TT |
| 55 | 4C | INNN | 1.516 | 0.132 | CC |
| 56 | 5C | INNN | 1.606 | 0.108 | CC |
| 57 | 6C | INNN | -0.139 | 5.061 | TT |
| 58 | 7C | INNN | 1.555 | 0.102 | CC |
| 59 | 25C | INNN | 1.107 | 0.06 | CC |
| 60 | 31C | INNN | 0.869 | 3.82 | CT |
| 61 | 32C | INNN | 1.308 | 0.027 | CC |
| 62 | 33C | INNN | 0.953 | 3.525 | CT |
| 63 | 35C | INNN | -0.077 | 3.943 | TT |
| 64 | 36C | INNN | 1.287 | 0.01 | CC |

| | | | | | |
|----|-----|------|-------|--------|----|
| 65 | 37C | INNN | 1.428 | 0.077 | CC |
| 66 | 38C | INNN | 1.576 | 0.112 | CC |
| 67 | 40C | INNN | 1.486 | 0.137 | CC |
| 68 | 41C | INNN | 1.63 | 0.125 | CC |
| 69 | 42C | INNN | 1.599 | -0.039 | CC |
| 70 | 44C | INNN | 1.791 | 0.261 | CC |

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y OR del gen RUNX1.

| | TT | TC | CC |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Pacientes | 14 (0.21) | 9 (0.13) | 45 (0.66) |
| Controles | 3 (0.04) | 18 (0.26) | 49 (0.70) |

| | Pacientes | Controles |
|----------------------|-----------|-----------|
| Factor de Riesgo (+) | 14 | 3 |
| Factor de Riesgo (-) | 54 | 67 |

OR = 5.79

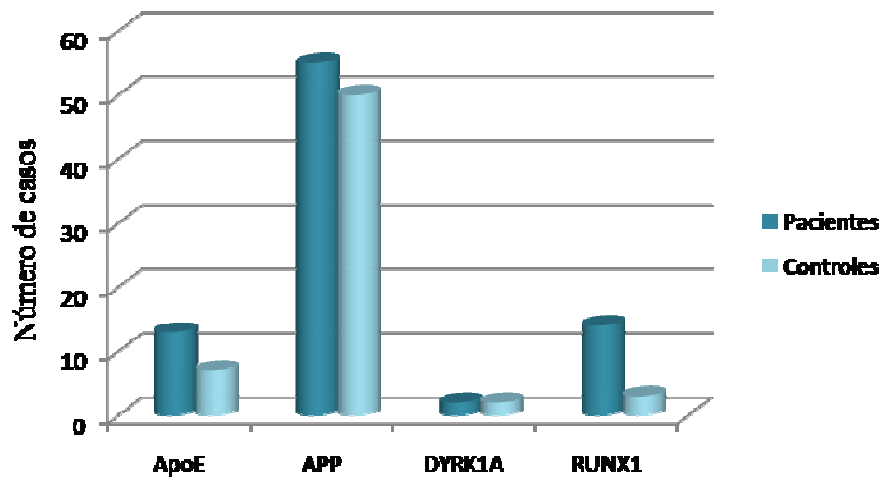
En los genes APOE, APP y RUNX1 encontramos un $OR > 1.11$, lo que indica que la presencia de SNPs en dichos genes se asocia a mayor ocurrencia de la EA [tablas 3, 6 y 9].

* Análisis de resultados

Se incluyeron los genotipos del alelo $\epsilon 4$ de ApoE en pacientes y controles obtenidos previamente en el Servicio de Genética del HGM, pues ya antes se han reportado SNPs en estos alelos que representan un factor de riesgo para desarrollar la EA. En nuestra población, el alelo $\epsilon 4$ se presenta con una incidencia del 19% en los pacientes y 10% para los controles. En la tabla 10 y en la gráfica 2 se muestra el número de pacientes y controles que presentaron los GR. El polimorfismo más frecuente en los pacientes fue el de gen APP (81%), mientras que el polimorfismo con la menor frecuencia fue el del gen DYRK1A (3%).

Tabla 10. Frecuencia de GR de los genes analizados.

| Genotipos de riesgo | Pacientes | Controles |
|---------------------|-----------|-----------|
| ApoE | 13 (19%) | 7 (10%) |
| APP | 55 (81%) | 50 (71%) |
| DYRK1A | 2 (3%) | 2 (3%) |
| RUNX1 | 14 (21%) | 3 (4%) |



Gráfica 2. Número de pacientes y controles con los GR

En las tablas 11 y 12 se encuentran los GR que presenta cada caso estudiado

Tabla 11. GR acumulados en pacientes.

Los GR de cada gen se encuentran en **rojo**

| Procedencia | No. Paciente | Sexo | Edad | ApoE | APP | DYRK1A | RUNX1 | Núm. de GR acumulados |
|-------------|--------------|------|------|-------|-----|--------|-------|-----------------------|
| HGM 1 | 1 | M | 82 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| HGM 2 | 2 | F | 61 | E3/E3 | GA | CT | CC | 0 |
| HGM 3 | 3 | M | 62 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| HGM 4 | 4 | M | 83 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| HGM 5 | 5 | F | 60 | E3/E4 | AA | TT | TT | 3 |
| HGM 6 | 6 | F | 76 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 7 | 7 | F | 84 | E3/E3 | AA | TT | TT | 2 |
| HGM 8 | 8 | F | 70 | E3/E3 | | | CT | 0 |
| HGM 9 | 9 | F | 65 | E3/E4 | AA | TT | CC | 2 |
| HGM 10 | 10 | F | 85 | E3/E3 | AA | TT | CC | 2 |
| HGM 11 | 11 | F | 68 | E3/E3 | AA | CT | TT | 2 |
| HGM 12 | 12 | M | 81 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |
| HGM 13 | 13 | M | 75 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| HGM 14 | 14 | F | 80 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| HGM 15 | 15 | F | 68 | E3/E3 | AA | CT | CT | 1 |
| HGM 16 | 16 | F | 77 | E3/E4 | AA | TT | CT | 2 |
| HGM 17 | 17 | F | 64 | E3/E3 | AA | TT | CC | 2 |
| HGM 18 | 18 | F | 65 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |
| HGM 19 | 19 | M | 75 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| HGM 20 | 20 | F | 81 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 21 | 21 | F | 70 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| INN 1 | 22 | F | 83 | E3/E4 | AA | TT | CC | 2 |
| INN 2 | 23 | F | 79 | E3/E3 | AA | CT | CC | 2 |
| INN 3 | 24 | M | 82 | E3/E3 | GA | CT | CC | 0 |
| INN 4 | 25 | F | 74 | E3/E4 | GA | TT | CT | 1 |
| INN 5 | 26 | F | 75 | E3/E3 | AA | TT | CC | 2 |
| INN 6 | 27 | F | 76 | E4/E4 | AA | CT | TT | 3 |
| INN 7 | 28 | F | 74 | E3/E3 | AA | CC | CC | 3 |
| INN 8 | 29 | F | 92 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 9 | 30 | F | 81 | E3/E4 | AA | TT | TT | 3 |
| INN 10 | 31 | M | 76 | E3/E3 | AA | CT | CC | 2 |
| INN 11 | 32 | M | 73 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 12 | 33 | M | 81 | E3/E4 | AA | TT | CC | 2 |
| INN 13 | 34 | F | 80 | E3/E3 | AA | TT | CT | 2 |
| INN 14 | 35 | F | 71 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 15 | 36 | F | 79 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |

| | | | | | | | | |
|--------|----|------------|------------|-------|----|----|----|---|
| INN 16 | 37 | M | 87 | E3/E3 | GA | CT | TT | 1 |
| INN 17 | 38 | M | 76 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 18 | 39 | F | 90 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 19 | 40 | F | 73 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| INN 20 | 41 | M | 87 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 21 | 42 | F | 86 | E3/E3 | GA | TT | TT | 1 |
| INN 22 | 43 | M | 82 | E3/E3 | AA | TT | TT | 2 |
| INN 23 | 44 | F | 73 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INN 24 | 45 | F | 87 | E3/E3 | GG | TT | CT | 0 |
| INN 25 | 46 | M | 74 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 26 | 47 | F | 73 | E3/E3 | GG | TT | CC | 0 |
| INN 27 | 48 | M | 65 | E3/E3 | GA | TT | CT | 0 |
| INN 28 | 49 | M | 75 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 22 | 50 | F | 77 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 23 | 51 | M | 77 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| HGM 24 | 52 | M | 68 | E3/E3 | AA | CC | CC | 2 |
| HGM 25 | 53 | M | 84 | E3/E3 | AA | CT | TT | 2 |
| HGM 26 | 54 | M | 83 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 29 | 55 | F | 82 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 30 | 56 | F | 86 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 31 | 57 | M | 78 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 32 | 58 | F | 82 | E3/E3 | AA | CT | TT | 2 |
| INNN1 | 59 | F | 62 | E4/E3 | AA | TT | TT | 3 |
| INNN2 | 60 | M | 67 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| INNN3 | 61 | F | 69 | E4/E3 | AA | CT | CC | 2 |
| INNN4 | 62 | M | 59 | E3/E3 | AA | TT | TT | 2 |
| INNN5 | 63 | M | 67 | E3/E3 | GA | CT | TT | 1 |
| INNN6 | 64 | M | 66 | E4/E3 | AA | CT | CC | 2 |
| INNN7 | 65 | F | 70 | E4/E3 | AA | TT | CC | 2 |
| INNN8 | 66 | F | 69 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INNN9 | 67 | F | 82 | E3/E3 | GA | CT | TT | 1 |
| INNN10 | 68 | M | 73 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INNN11 | 69 | F | 82 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| | | 27 M (40%) | 75.6376812 | 13 | 55 | 2 | 14 | |
| | | 41 F (60%) | [60-92] | | | | | |

Tabla 12. GR acumulados en controles.

Los GR de cada gen se encuentran en rojo

| Procedencia | No. Paciente | Sexo | Edad | ApoE | APP | DYRK1A | RUNX1 | Núm. de GR acumulados |
|-------------|--------------|------|------|-------|-----|--------|-------|-----------------------|
| HGM 1 | 1 | F | 65 | E3/E4 | AA | TT | CC | 2 |
| HGM 2 | 2 | F | 75 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| HGM 3 | 3 | F | 81 | E3/E4 | GA | CT | CC | 1 |
| HGM 4 | 4 | F | 60 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| HGM 5 | 5 | M | 73 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 6 | 6 | M | 68 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| HGM 7 | 7 | F | 60 | E3/E4 | AA | CT | CC | 2 |
| HGM 8 | 8 | F | 75 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| HGM 9 | 9 | F | 67 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |
| HGM 10 | 10 | F | 67 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 11 | 11 | M | 60 | E3/E4 | AA | CT | CT | 2 |
| HGM 12 | 12 | M | 68 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 13 | 13 | M | 68 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| HGM 14 | 14 | F | 73 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 15 | 15 | M | 69 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |
| HGM 16 | 16 | F | 73 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| INN 1 | 17 | F | 89 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |
| INN 2 | 18 | F | 75 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| INN 3 | 19 | M | 86 | E3/E3 | GA | CC | CC | 1 |
| INN 4 | 20 | M | 87 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| INN 5 | 21 | M | 86 | E3/E3 | AA | CT | CT | 1 |
| INN 6 | 22 | F | 91 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| INN 7 | 23 | M | 80 | E3/E2 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 8 | 24 | F | 76 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INN 9 | 25 | M | 76 | E3/E2 | AA | TT | CT | 1 |
| INN 10 | 26 | F | 82 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |
| INN 11 | 27 | M | 71 | E3/E3 | GA | CT | CC | 0 |
| INN 12 | 28 | F | 87 | E3/E3 | AA | CT | CT | 1 |
| INN 13 | 29 | F | 70 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| INN 14 | 30 | F | 69 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 15 | 31 | M | 90 | E3/E3 | AA | CT | CT | 1 |
| INN 16 | 32 | F | 81 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 17 | 33 | F | 78 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 18 | 34 | F | 84 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INN 19 | 35 | F | 81 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 20 | 36 | F | 92 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 21 | 37 | M | 77 | E3/E3 | AA | CT | CC | 1 |
| INN 22 | 38 | F | 85 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |

| | | | | | | | | |
|---------|----|---|----|-------|----|----|----|---|
| INN 23 | 39 | M | 80 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INN 24 | 40 | F | 71 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 25 | 41 | M | 76 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 26 | 42 | F | 71 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |
| INN 27 | 43 | F | 69 | E3/E3 | AA | CT | CT | 1 |
| INN 28 | 44 | F | 83 | E3/E3 | GA | CT | CT | 0 |
| INN 29 | 45 | F | 76 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INN 30 | 46 | F | 75 | E3/E2 | AA | CT | CC | 1 |
| INN 31 | 47 | F | 84 | E3/E3 | AA | CT | CT | 1 |
| INN 32 | 48 | F | 73 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INN 33 | 49 | M | 78 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |
| INN 34 | 50 | F | 75 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| HGM 17 | 51 | F | 68 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 18 | 52 | F | 80 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| HGM 19 | 53 | F | 69 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INNN 1 | 54 | F | 76 | E3/E3 | GA | TT | TT | 1 |
| INNN 2 | 55 | M | 62 | E3/E4 | AA | TT | CC | 2 |
| INNN 3 | 56 | F | 75 | E3/E3 | AA | TT | CC | 1 |
| INNN 4 | 57 | M | 67 | E3/E3 | GA | CT | TT | 1 |
| INNN 5 | 58 | F | 68 | E3/E3 | GA | CC | CC | 1 |
| INNN 6 | 59 | M | 60 | E3/E4 | AA | TT | CC | 2 |
| INNN 7 | 60 | M | 63 | E3/E3 | AA | CT | CT | 1 |
| INNN 8 | 61 | F | 62 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INNN 9 | 62 | F | 79 | E3/E3 | AA | TT | CT | 1 |
| INNN 10 | 63 | M | 67 | E3/E3 | AA | CT | TT | 2 |
| INNN 11 | 64 | M | 63 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INNN 12 | 65 | M | 60 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INNN 13 | 66 | F | 62 | E3/E4 | AA | TT | CC | 2 |
| INNN 14 | 67 | M | 62 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INNN 15 | 68 | F | 64 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |
| INNN 16 | 69 | M | 60 | E3/E2 | AA | TT | CC | 1 |
| INNN 17 | 70 | M | 60 | E3/E3 | GA | TT | CC | 0 |

27 M (39%) 73.3285714 7 50 2 3
43 F (61%) [60-92]

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y OR del gen ApoE.

| | E2/E2 | E2/E3 | E3/E3 | E2/E4 | E3/E4 | E4/E4 |
|-----------|-------|----------|-----------|-------|-----------|----------|
| Pacientes | 0 | 0 | 57 (0.83) | 0 | 11 (0.16) | 1 (0.01) |
| Controles | 0 | 4 (0.06) | 59 (0.84) | 0 | 7 (0.10) | 0 |

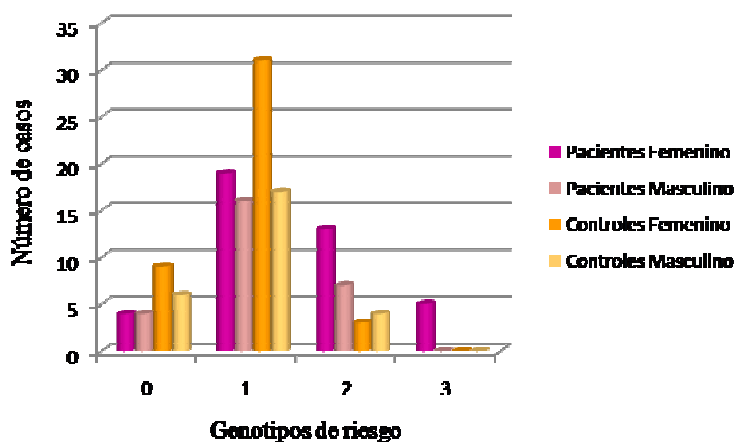
| | Pacientes | Controles |
|------------------------|-----------|-----------|
| Factor de Riesgo (E4+) | 13 | 7 |
| Factor de Riesgo (E4-) | 125 | 133 |

OR = 1.98

De los 68 pacientes analizados, 5 casos del sexo femenino (7.3%) presentaron tres GR acumulados como máximo. Mientras que 13 mujeres (19.1%) y 7 hombres (7.4%) presentan dos GR acumulados. A diferencia de los 70 controles, 3 mujeres (4.3%) y 4 hombres (5.7%) presentan dos GR acumulados. Es importante resaltar que ninguna de los pacientes presentó los cuatro GR estudiados [tabla 14 y gráfica 3].

Tabla 14. GR acumulados en pacientes y controles.

| GR acumulados | Pacientes | | Controles | |
|---------------|------------|------------|------------|------------|
| | Femenino | Masculino | Femenino | Masculino |
| 0 | 4 (5.9%) | 4 (5.9%) | 9 (12.9%) | 6 (8.6%) |
| 1 | 19 (27.9%) | 16 (26.5%) | 31 (44.3%) | 17 (24.3%) |
| 2 | 13 (19.1%) | 7 (7.4%) | 3 (4.3%) | 4 (5.7%) |
| 3 | 5 (7.3%) | 0 | 0 | 0 |



Gráfica 3. GR acumulados en pacientes y controles.

VI. DISCUSIÓN

En los últimos años se han realizado diversos estudios de casos y controles con el fin de asociar polimorfismos genéticos con distintas enfermedades neurodegenerativas. En este trabajo encontramos que existe una asociación positiva entre los SNPs de los genes APP y RUNX1 con la EA en población mexicana. Para el caso de DYRK1A no fue posible establecer una relación con la enfermedad; ya que obtuvimos un OR <1.11.

Además de estos tres genes, se incluyeron datos de **ApoE ε4** debido a que es considerado el factor de riesgo más importante para desarrollar EA. Este alelo participa en el anclaje y depósito de la proteína Aβ y la fosforilación de la proteína Tau. Encontramos que la incidencia del alelo ε4 es de 19% en pacientes y 10% en controles con un OR de 1.98.

Olson, *et al.* (2001) realizaron un estudio de ligamiento del cromosoma 21 con la EA de inicio tardío en población estadounidense, mostrando una Puntuación LOD de 0.05 para la región q21.3 donde se localiza el gen **APP**. Y observaron que el LOD score incrementó a 1.13 cuando se agrega ε4 [100].

La hipótesis del Aβ está sustentada en el estudio de ratones transgénicos que sobreexpresan APP mutante, los cuales presentan una concentración muy elevada del péptido Aβ en las PS en las mismas regiones que en humanos con la EA [101]. Sin embargo, en estos ratones se observó también que los depósitos de Aβ no dependen sólo de la concentración de dicho péptido, ya que no siempre una concentración alta de Aβ conduce al desarrollo de PS, lo cual sugiere que existen otros factores que intervienen en la aparición de PS [102]. Debido a que la producción de Aβ depende del gen APP, es posible que la regulación de expresión de éste pueda contribuir al desarrollo de la EA.

Lv *et al.* (2008) secuenciaron 1150 fragmentos del promotor proximal de APP en 20 individuos y caracterizaron tres SNPs: -877T/C, -955A/G y -9G/C. Obtuvieron un OR = 1.7 para -955A/G (rs364048) ya que se encontraron con mayor incidencia en pacientes con respecto a los controles y se determinó un efecto alelo-dosis en los homocigotos -955A, incluso en sujetos sin ε4. Los SNPs pueden llegar a un cambio importante en los niveles de expresión y contribuir al desarrollo de la EA [85].

En este trabajo encontramos el genotipo AA del gen **APP** en 55 pacientes y 50 controles, lo que conlleva a un OR de 1.69 indicando una fuerte asociación con la EA.

Kimura *et al.* (2007) realizaron un estudio de ligamiento, en población japonesa, para la EA de inicio tardío con 417 marcadores del cromosoma 21. Obtuvieron resultados positivos en la región q22.13 donde se localizan los genes SAMS1, PRSS7, NCAM2, KCNJ6, DYRK1A y RUNX1. Posteriormente realizaron la genotipificación de diferentes SNPs en éstos genes, obteniendo una fuerte asociación con **DYRK1A** (rs2835740) y **RUNX1** (rs4816501), con valores de OR de 2.99 y 23.3 respectivamente.

El mRNA **DYRK1A** es expresado especialmente en el cerebro y se inmunolocaliza en corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. Se ha detectado que en pacientes con Síndrome de Down se encuentra sobreexpresado; es por ello que éste gen es considerado como el responsable del deterioro de la memoria y el aprendizaje en estos pacientes [103]. Los residuos de la proteína Tau: Ser-202, Thr-212 y Ser-404 son fosforilados por Dyrk1A *in vivo* e *in vitro*, y la fosforilación general de Tau se ve incrementada en los cerebros de ratones transgénicos que contienen dos copias del gen Dyrk1A de ratón y una copia de la proteína DYRK1A humana [104]. Sin embargo, en ratones transgénicos con sobreexpresión de Dyrk1A no se incrementa la fosforilación específica en Thr de Tau, lo que sugiere que esta sobreexpresión de Dyrk1A no tiene relación *per se* con la hiperfosforilación en Thr de Tau *in vivo* [105]. También se ha observado que Dyrk1A fosforila APP en Thr-668 *in vitro* e *in vivo*, y causa un incremento en la agregación de A β , por lo que DYRK1A se propone como blanco terapéutico para pacientes con la EA y SD [104] a través de la reducción de los niveles de A β y de la fosforilación anormal de Tau [106]. Kimura *et al.* (2007) observaron en cultivos celulares que la sobreexpresión de Tau fosforilada en Thr por Dyrk1A, puede ser una consecuencia río abajo de la sobreproducción de A β , por lo que posiblemente la fosforilación de Tau en Thr es una respuesta de protección contra la muerte neuronal [103].

Sin embargo, en la población del presente trabajo, observamos que el gen **DYRK1A** presenta el polimorfismo CC, en 2 de los pacientes y en 2 de los controles, por lo que en el análisis estadístico observamos un OR=1.03.

El caso más representativo de este estudio lo encontramos en el polimorfismo TT del gen **RUNX1** en 14 pacientes y 3 controles, presentando un OR=5.79. Estos resultados nos indican su fuerte asociación con la EA.

Tres de los genes analizados en este trabajo (ApoE, APP y RUNX1) mostraron una asociación positiva con la enfermedad, de la misma forma que en estudios previos realizados en otras poblaciones; con lo que se confirma la relación de estos con la EA. Sin embargo, DYRK1A presentó un valor ligeramente por debajo de 1.11 y no logramos establecer una relación con la enfermedad.

Se ha observado una mayor incidencia de la EA en mujeres, aunque se desconoce con certeza la razón, se ha propuesto que se debe a una mayor longevidad de estas. Los datos generados en este proyecto nos indican que las mujeres tienen un porcentaje mayor en cuanto a la acumulación de GR, pues presentaron 3 GR (7.3%) de las pacientes femeninas y ningún varón. Es posible extender el análisis de estos resultados a través de una ANOVA con el fin de establecer la causa de dicha incidencia, dado que puede deberse a la proporción de sexos en las muestras.

Este estudio se puede fortalecer agregando datos de pacientes con la EA confirmada por estudios histopatológicos *post mortem*, a manera de controles positivos y así establecer una asociación con los GR acumulados en estudios sanguíneos. Por otro lado para corroborar que los valores OR de los genes estudiados, efectivamente se relacionan con la EA, sería necesario añadir controles negativos para analizar frecuencia y OR de genes que se conocen no están ligados a esta enfermedad.

VII. CONCLUSIONES

Se encontró una proporción entre el grupo de pacientes y el grupo control de acuerdo al Equilibrio de Hardy-Weinberg para cada gen estudiado.

Los genes APOE, APP y RUNX1 presentaron un $OR > 1.11$, lo que indica una asociación positiva con el desarrollo de la EA de inicio tardío en pacientes mexicanos.

El OR obtenido del gen DYRK1A fue de 1.03 por lo que no es posible establecer su asociación con la EA.

El polimorfismo de riesgo más frecuente en los pacientes con EA corresponde al gen APP seguido por RUNX1, APOE y finalmente DYRK1A.

Encontramos dos GR acumulados en 26.5% de los pacientes vs 9.7% de los controles y tres GR acumulados como máximo en 7.3% de pacientes femeninas. De tal manera que 33.8% de los pacientes vs 9.7% de los controles presentaron ≥ 2 GR.

Agradecimientos.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) Clave No.2004-C01-129, la Secretaria de Desarrollo Institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**) Grant con No. SDEI. PTID.05.5 y la Dirección de Investigación del Hospital General de México (**HGM**) con Clave de Registro Dic/04/311/03/074.

VIII. ANEXOS

A. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D. F.; a ____ de _____ 200-

Yo _____, en mi calidad de representante legal y/o familiar de _____ otorgo el consentimiento para que a mi y a mi familiar nos sean practicados los estudios genéticos considerados en el proyecto de investigación titulado **“Análisis de polimorfismos génicos asociados con la demencia tipo Alzheimer en población mexicana”** Se me ha explicado que cuando esta enfermedad se inicia después de los 60 años están involucrados tanto factores genéticos como ambientales. También me comentaron que múltiples estudios realizados en diferentes poblaciones del mundo han mostrado la existencia de polimorfismos génicos que aumentan la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad. Me informaron que el objetivo fundamental de este proyecto es conocer cuales son los polimorfismos génicos que están asociados con la demencia en población Mexicana. Se me ha explicado con detenimiento que nuestra participación consiste en que nos sean extraídos con jeringa (4ml) de sangre venosa, que no ocasionará molestias mayores (riesgo menor al mínimo) y que solo pudiera presentarse la formación de un pequeño moretón en el área puncionada. Además se nos ha asegurado que la información obtenida en este estudio y relacionada con nuestro patrimonio genético no será divulgada ni usada para otros fines que no sean los establecidos en el proyecto de investigación mencionado. El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre los resultados del estudio, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee sobre dicho estudio o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo de este servicio.

Nombre y Firma del Representante
Dirección y Teléfono

Firma Investigador Principal*
Dr. Carlos Venegas

Testigo (1) Nombre y Firma
Dirección y Teléfono

Firma Investigador Asociado*
M en C Nayeli Najera García

Testigo (2) Nombre y Firma
Dirección y Teléfono

Firma Investigador Asociado*
Dr.

* Dirección: Servicio de Genética. Hospital General de México Teléfono: 27892000 Ext. 1278 y 1279

B. Criterios DSM-IV para el diagnóstico de la EA

Desarrollo de deficiencia cognitiva múltiple, manifestada por:

- Alteración de memoria (aprender nueva información y evocar la ya aprendida) y una o más de las siguientes alteraciones cognitivas: afasia, apraxia, agnosia y/o alteración de funciones ejecutivas.
- Las alteraciones previas representan un deterioro con respecto a las capacidades previas del paciente y producen dificultades significativas en las funciones ocupacional y social.
- La evolución se caracteriza por insaturación gradual y deterioro cognitivo continuo.
- Las alteraciones de memoria expresadas no se deben a los siguiente:
 - Otros trastornos del SNC que puedan ocasionar deterioro progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas, por ejemplo: enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia de presión normal, tumor cerebral.
 - Trastornos sistémicos que pueden ocasionar demencia, por ejemplo, hipotiroidismo, deficiencia de vitamina B12, ácido fólico, niacina, hipercalcemia, neurosífilis, SIDA.
 - Intoxicaciones.
- Las alteraciones no ocurren únicamente durante un síndrome confusional agudo.
- El trastorno no es atribuible a una alteración psiquiátrica que pudiera justificar las manifestaciones, como por ejemplo una depresión mayor o una esquizofrenia.

C. Protocolo para purificar ADN de 0.4 a 3.0 mL de sangre.

VersaGene ADN Blood Kit Gentra Systems.

a) Lisis de células rojas sanguíneas o eritrocitos (Red Blood Cell, RBC)

1. Mezclar 1 volumen de sangre con 3 volúmenes de RBC Lysis Solution en un tubo de 15 a 50 mL.
2. Invertir 5 veces para mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Invertir al menos una vez más durante la incubación.
3. Centrifugar a 2 000 x g por 1 minuto para formar un botón (células empaquetadas) de células blancas sanguíneas o leucocitos (White blood cells, WBC).
4. Retirar el sobrenadante e invertir el tubo sobre un papel limpio absorbente por 1 minuto. Dar de 5 a 10 golpecitos sobre dicho papel para remover el exceso de residuos de células rojas lisadas como sea posible, sin alterar el botón de WBC.
5. Mezclar el botón de WBC a alta velocidad por 30 segundos hasta re-suspender las células.
6. Agregar 500 µL de RBC Lysis Solution para re-suspender las células.
7. Mezclar a alta velocidad por 30 segundos para mezclar.
8. Transferir la suspensión de células a un tubo de 10mL.
9. Centrifugar 2 000 x g por 1 minuto para obtener un botón de células.
10. Retirar el sobrenadante e invertir el tubo sobre un papel limpio absorbente por 1 minuto. Dar de 5 a 10 golpecitos para remover el exceso de residuos de células rojas lisadas como sea posible, sin alterar el botón de WBC.

11. Mezclar el botón a alta velocidad por 30 segundos para resuspender completamente los leucocitos.

b) Lisis de células blancas sanguíneas o leucocitos (White blood cells, WBC).

1. Agregar 400µL de Lysis Solution para re-suspender las células.
2. Mezclar a alta velocidad por 30 segundos para lisar las células.
3. Agregar 700µL de Binding Solution para lisar.
4. Pulsar 5 veces en el vórtex para mezclar.

c) Unión de ADN y Lavado

1. Pipetear 600µL del lisado a otra columna de purificación.
2. Centrifugar a 7 000 x g por 1 minuto.
3. Retirar el lavado y re-usar el tubo colector.
4. Pipetear el resto del lisado a la columna de purificación.
5. Centrifugar a 7 000 x g por 1 minuto.
6. Transferir la columna de purificación a un nuevo tubo.
7. Agregar 200µL de Wash Solution a la columna de purificación.
8. Centrifugar a 7 000 x g por 1 minuto.
9. Agregar 200µL de Wash Solution a la columna de purificación.
10. Centrifugar a 13 000-16 000 x g por 2 minutos.

d) Elución del ADN

1. Transferir la columna de purificación a un nuevo tubo.
2. Agregar 100µL de Elution Solution a la columna de purificación.
3. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Centrifugar a 13 000-16 000 x g por 1 minuto.
5. Agregar 100µL de Elution Solution a la columna de purificación.
6. Centrifugar a 13 000-16 000 x g por 2 minutos. Desechar la columna de purificación.
7. Almacenar la solución restante a 4°C por no más de 4 meses.
8. Antes de ser usado, se debe mezclar de 5 a 10 segundos a alta velocidad.

D. SNPs ESTUDIADOS

| | |
|--------------------------|--|
| APP | refSNP ID: rs364048 |
| | Organism: human (<i>Homo sapiens</i>) |
| chromosome 21 | Allele |
| Variation Class: | SNP: single nucleotide polymorphism |
| RefSNP Alleles: | C/T |
| Ancestral Allele: | T |

El gen APP se encuentra en la cadena antisentido y el alelo de riesgo es T; sin embargo, en este trabajo consideramos A (visto en la cadena codificante) como el alelo de riesgo de acuerdo al trabajo de Lv *et al*, 2008.

| | |
|--------------------------|--|
| DYRK1A | refSNP ID: rs2835740 |
| | Organism: human (<i>Homo sapiens</i>) |
| chromosome 21 | Allele |
| Variation Class: | SNP: single nucleotide polymorphism |
| RefSNP Alleles: | C/T |
| Ancestral Allele: | T |

El alelo de riesgo del gen DYRK1A es C, mismo que consideran en la publicación de Kimura *et al*, 2007 y en este trabajo.

| | |
|--------------------------|--|
| RUNX1 | refSNP ID: rs4816501 |
| | Organism: human (<i>Homo sapiens</i>) |
| chromosome 21 | Allele |
| Variation Class: | SNP: single nucleotide polymorphism |
| RefSNP Alleles: | C/T |
| Ancestral Allele: | C |

El gen RUNX1 se encuentra en la cadena antisentido, siendo el alelo de riesgo T. Este mismo se considera como alelo de riesgo en la publicación de Kimura *et al*, 2007 y en nuestro trabajo.

IX. GLOSARIO

- Alelo → Una de las dos variantes en las que puede presentarse un gen o un polimorfismo, en una posición específica del genoma.
- Astrocito → Célula de la glía más frecuente en el SNC.
- Colinérgico → Perteneciente o relativo a la transmisión nerviosa que utiliza como neurotransmisor la acetilcolina
- Corteza entorrinal → Estructura del lóbulo temporal medial relacionada con la memoria.
- Gen → Unidad física y funcional de la herencia que ocupa una posición específica en el genoma y está constituido por una secuencia de ADN que contiene la información para elaborar al menos una proteína específica.
- Glia → Conjunto de células provistas de largas prolongaciones ramificadas, que están situadas entre las células y fibras nerviosas.
- Hipocampo → Parte del cerebro situado en el lóbulo temporal que participa en la memoria y orientación espacial.
- Lóbulo temporal → Desempeña un papel importante en tareas visuales complejas, como el reconocimiento de caras. Recibe y procesa información del olfato, auditiva, contribuye al balance y el equilibrio, y regula emociones y motivaciones como la ansiedad, el placer y la ira.
- Locus Coeruleus → Región del tallo cerebral involucrada en la respuesta al pánico y al estrés.
- Microglia → Células pequeñas con núcleo alargado y prolongaciones cortas e irregulares que tienen capacidad fagocitaria. Se originan en precursores de la médula ósea y alcanzan el sistema nervioso a través de la sangre.

- Neurópilo → Porción del tejido nervioso que contiene una trama de procesos entremezclados e interconectados de células neuronales y gliales. Es en el neuropilo donde ocurren la mayoría de las interacciones sinápticas.
- Noradrenérgicos → Perteneciente o relativo a la transmisión nerviosa que utiliza como neurotransmisor la noradrenalina. El sistema noradrenérgico está centrado en el locus coeruleus, donde se almacena principalmente.
- Núcleos basales de Meynert → Involucrados en el procesamiento y la integración de aferencias sensitivas y en la modulación de respuestas motoras y emocionales.
- Polimorfismo → Variación en una posición o región específica en la secuencia de ADN que se presenta en al menos un 1% de la población.
- Polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) → Variación común en la secuencia de ADN que ocurre por el cambio de un solo nucleótido (A, T, G y C), con una frecuencia aproximada de 1 por cada 600 a 800 bases.
- Proteólisis → Degradación de proteínas mediante enzimas específicas llamadas proteasas o por medio de digestión intramolecular.
- Puntuación LOD → Método estadístico que utiliza los marcadores genéticos en familias para determinar si dos loci están ligados. El LOD score es el logaritmo de la probabilidad a favor del ligamiento. Por convención se acepta que un LOD Score de 3 (probabilidad de 1 000:1 a favor) es prueba de ligamiento y un LOD Score de -2 (100:1 en contra) es prueba de que los loci no están ligados.
- Quinasa → Enzima que transfiere grupos fosfato del ATP a un sustrato diana. El proceso se llama fosforilación. La diana puede activarse o inactivarse mediante la fosforilación.
- Señal autócrina → Las células implicadas, célula emisora y célula receptora, pertenecen a un mismo tipo celular, por lo que las señales liberadas, además de a otras células cercanas, también afectan a la propia célula secretora de la señal.

- Sinaptofisina → Glicoproteína ácida que se une al Ca^{++} que forma parte de la membrana de las vesículas sinápticas.
- Sistema límbico → Sistema formado por el tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala cerebral, cuerpo calloso, septum y mesencéfalo. Relacionado con respuestas fisiológicas ante estímulos emocionales.

X. REFERENCIAS

1. Zilka N., Novak M. 2006. The tangled story of Alois Alzheimer. *Bratisl Lek Listy*. 107 (9-10): 343-345.
2. Rodríguez-Santiago B., Casademont J., Nunes V. 2001. *¿Existe relación entre la enfermedad de Alzheimer y defectos en el ADN mitocondrial?* *Rev Neurol*. 33 (4): 301-305.
3. Schindowski K., Belarbi K., Bue´e L. 2008. *Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport*. *Genes, Brain and Behavior*. 7:43-56.
4. Ferri C.P., Prince M., Brayne C., et al. 2005. *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. *Lancet*. 366: 2112–17.
5. Li M., Chen L., Hong D., Yu L., Zhang Y. 2007. *The role of intracellular amyloid b in Alzheimer's disease*. *Progress in Neurobiology*. 83. 131–139.
6. Clarimon J., Bertranpetit J., Boada M., Tarrasa L., Comas D. 2003. *HSP70-2 (HSPA1B) Is Associated With Noncognitive Symptoms in Late-Onset Alzheimer's Disease*. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*. 16: 1-5.
7. Mayeux R. 2003. *Epidemiology of neurodegeneration*. *Annu Rev Neurosci*. 26: 81–104.
8. Jellinger K. A. 2004. *Head injury and dementia*. *Curr Opin Neurol*. 17: 719–23.
9. Nussbaum R. L. y Ellis C. E. 2003. *Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. *N Engl J Med* 348 (14): 1356-64.
10. Luchsinger J.A., Mayeux R. 2004. *Dietary factors and Alzheimer's disease*. *Lancet Neurol*. 3: 579–87.
11. Gatz M., Reynolds C. A., Fratiglioni L., et al. 2006. *Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease*. *Arch Gen Psychiatry*. 63: 168–74.
12. Brown R.C., Lockwood A.H., Sonawane B. R. 2005. *Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors*. *Environ Health Perspec*. 113: 1250–1256.
13. Espinosa R., Lemons R. S., Perlman R. K., Kuo W. L., Rosner M. R., Le Beau M. M. 1991. *Localization of the gene encoding insulin-degrading enzyme to human chromosome 10, bands q23---q25*. *Cytogenet Cell Genet* 57(4): 184-6.

14. Chui H. C., Tierney M., Zarow C., Lewis A., Sobel E., Perlmutter L. S. 1993. *Neuropathologic diagnosis of Alzheimer disease: interrater reliability in the assessment of senile plaques and neurofibrillary tangles*. Alzheimer Dis Assoc Disord 7(1): 48-54.
15. Bacskai B. J., Klunk W. E., Mathis C. A. y Hyman B. T. 2002. *Imaging amyloid-beta deposits in vivo*. J Cereb Blood Flow Metab 22(9): 1035-41.
16. DeKosky. 2002. *Neurobiología y biología molecular de la enfermedad de Alzheimer*. Rev Neurol. 35 (8): 752-760.
17. Blennow K., J de Leon M., Zetterberg H. 2006. *Alzheimer's disease*. Lancet 368: 387–403.
18. Gotz J., Chen F., Van Dorpe J., Nitsch R. M. 2001. *Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils*. Science 293: 1491–1495.
19. Lewis J., Dickson D. W., Lin W.-L., Chisholm L., Corral A., Jones J., Yen S.-H., Sahara N., Skipper L., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M., McGowan E., 2001. *Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and PPA*. Science 293: 1487–1491.
20. Seshadri S., Wolfe P. A., Beiser A., Au R., McNulty K., White R., D'Agostino R.B. 1997. *Life-time risk of dementia and Alzheimer's disease*. Neurology 49: 1498–1504.
21. Christen Y. 2000. *Oxidative stress and Alzheimer's disease*. Am. J. Clin. Nutr. 71 (Suppl.): 621S–629S.
22. De Lacoste M. C. y White C. L. 1993. *The role of cortical connectivity in Alzheimer's disease pathogenesis: a review and model system*. Neurobiology Aging. 14: 1-16.
23. Nestor P. J., Scheltens P., Hodges J. R. 2004. *Advances in the early detection of Alzheimer's disease*. Nature Medicine. 10:S34-41.
24. Arendt T. 2004. *Neurodegeneration and plasticity*. Internacional Journal of Developmental Neuroscience. 22:507-514.
25. Welsh K. A., Butters N., Hughes J. P., Mohs R. C., Heyman A. 1992. *A detection and staging of dementia in Alzheimer's disease: use of the neuropsychological measure developed for the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*. Arch. Neurobiology. 49: 448-452.

26. Lambon-Ralph M. A., Patterson K., Graham N., Dawson K., Hodges J. R. 2003. *Homogeneity and heterogeneity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a cross-sectional and longitudinal study of 55 cases.* Brain. 126: 2350-2362.
27. DeKosky S. T., Scheff S. W. 1990. *Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity.* Ann Neurol. 27: 457-464.
28. Terry R. D., Masliah E., Salmon D. P., Butters N., De Teresa R., Hill R., et al. 1991. *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlative of cognitive impairment.* Ann Neurol. 30: 572-580.
29. Spires T. L., Hannan A. J. 2007. *Molecular mechanisms mediating pathological plasticity in Huntington's disease and Alzheimer's disease.* Journal of Neurochemistry. 100, 874–882.
30. Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., et al. 1992. *Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism.* Nature. 359: 322–25.
31. Nishimoto I., Okamoto T., Matsuura Y., Okamoto T., Murayama Y., Ogata E. 1993. *Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G.* Nature 362: 75–79.
32. Jung S. S., Nalbantoglu J., Cashman N. R. 1996. *Alzheimer's β -amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study.* Journal of Neuroscience Res. 46 (3): 336-48.
33. Storey E., Spurck T., Pickett-Heaps J., Beyreuther K., Masters C. L.. 1996. *The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not actively motile portions of neurites.* Brain Res. 735: 59–66.
34. Milward E. A., Papadopoulos R., Fuller S. J., Moir R. D., Small D., Beyreuther K., Masters C.L. 1992. *The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth.* Neuron 9(1): 129-37.
35. Qiu W. Q, Ferreira A., Miller C. 1995. *Cell-Surface P-Amyloid Precursor Protein Stimulates Neurite Outgrowth of Hippocampal Neurons in an Isoform-Dependent Manner.* The Journal of Neuroscience. 75 (3): 2157-2167.
36. Yamazaki T., Koo E. H., Selkoe D. J. 1997. *Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells.* The Journal of Neuroscience. 17 (3): 1004–1010.

37. Marquez-Sterling N. R., Lo A. C. Y., Sisodia S. S., Koo E. H. 1997. *Trafficking of Cell-Surface β -Amyloid Precursor Protein: Evidence that a Sorting Intermediate Participates in Synaptic Vesicle Recycling*. The Journal of Neuroscience. 17(1): 140–151.
38. Chen Y., McPhie D. L., Hirschberg, Neve R. L. 2000. *The amyloid precursor protein-binding protein PPA-BP1 drives the cell cycle through the S–M checkpoint and causes apoptosis in neurons*. Journal of Biol. Chem. 275: 8929–8935.
39. Cao X., Sudhof T.C. 2001. *A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of PPA with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60*. Science 293 (5527): 115-20.
40. Luo L., Tully T., White K. 1992. *Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for PPA1 gene*. Neuron. 9: 595-605.
41. Moya K. L., Benowitz L. I., Schneider G. E., Allinquant B. 1994. *The Amyloid Precursor Protein Is Developmentally Regulated and Correlated with Synaptogenesis*. Developmental Biology. 161: 597-603.
42. Mucke L., Masliah E., Johnson W.B., Ruppe M.D., Alford M., Rockenstein E.M., Forss-Petter S., Pietropaolo M., Mallory M., Abraham C.R. 1994. *Synaptotrophic effects of human amyloid/3 protein precursors in the cortex of transgenic mice*. Brain Research 666: 151-167.
43. Ohtsubo K., Izumiyama N., Shimada H., Tachikawa T., Nakamura H. 1990. *Three-dimensional structure of Alzheimer's neurofibrillary tangles of aged human brain revealed by the quick freeze, deep-etch and replica method*. Acta Neuropathol. 79: 480-485.
44. Terry R. D., Masliah E., Hansen L. A. 1994. *Structural basis of the cognitive alterations in Alzheimer disease*. New York: Raven Press. 179-196.
45. Braak E., Braak H., Mandelkow E. M. 1994. *A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads*. Acta Neuropathol. 87 (6): 554-567.
46. Hof P., Morrison J. H. 1994. *The cellular basis of cortical disconnection in Alzheimer's disease and related dementing conditions*. New York: Raven Press: 197-229.

47. Mattson M. P. 1994. *Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta amyloid precursor protein mistreatment, free radicals, and metabolic compromise.* Ann NY Acad Sci 747: 50-76.
48. Furukawa K. Sopher B. L., Rydel R. E., Begley J. G., Pham D. G., Martin G. M., et al. 1996. *Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain.* J. Neurochemistry. 67: 1882-1896.
49. Haass C., Selkoe D. J. 1993. *Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide.* Cell. 75: 1039-1042.
50. Selkoe D. J. 1997. *Alzheimer disease: genotypes, phenotypes and treatments.* Science. 275: 630-631.
51. Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N., Ihara Y. 1994. *Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43).* Neuron 13(1): 45-53.
52. Esler W. P., Wolfe M. S. 2001. *A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces.* Science 293(5534): 1449-54.
53. Shastri B. S. 2003. *Neurodegenerative disorders of protein aggregation.* Neurochemistry International 43: 1-7.
54. Alonso A., Zaidi T., Novak M., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. 2001. *Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments.* Neurobiology. 98. 6923-6928.
55. Hardy J. 1997. *The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis?* Proc. Natl. Acad. 18: 2095-2097.
56. Verdile G., Fuller S., Atwood C. S., Laws S.M., Gandy S. E., Martins R. N. 2004. *The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught?* Pharmacol. Res. 50: 397-409.
57. Kowalska A. 2004. *The beta-amyloid cascade hypothesis: a sequence of events leading to neurodegeneration in Alzheimer's disease.* Neurol. Neurochir. Pol. 38: 405-411.

58. Hoyer A., Bardenheuer H. J., Martin E., Plaschke K. 2005. *Amyloid precursor protein (PPA) and its derivatives change after cellular energy depletion. An in vitro-study.* Journal of. Neural Transm. 112: 239–253.
59. Tabner B. J., El-Agnaf O. M., Turnbull S., German M. J., Paleologou, K. E., Hayashi Y., Cooper L. J., Fullwood N. J., Allsop D. 2005. *Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia.* Journal of Biol. Chem. 280: 35789–35792.
60. Lahiri D. K., Ghosh C., Ge Y.W. 2003. *A proximal gene promoter region for the beta-amyloid precursor protein provides a link between development, apoptosis, and Alzheimer's disease.* Ann. NY Acad. Sci. 1010: 643–647.
61. Dewji N. N., Do C., Bayney R.M. 1995. *Transcriptional activation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein gene by stress.* Brain Res. Mol. Brain Res. 33: 245–253.
62. Olsson A., Csajbok L., Ost M., Holund K., Nylén K., Rosengren L., Nellgad B., Blennow K. 2004. *Marked increase of beta-amyloid (1–42) and amyloid precursor protein in ventricular cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury.* Journal of. Neurology. 251: 870–876.
63. Hardy J., Selkoe D.J. 2002. *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.* Science. 297(5580): 353–6.
64. Dyrks T., Dyrks E., Hartmann T., Masters C., Beyreuther K. 1992. *Amyloidogenicity of β A4 and β A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation.* Journal of Biol. Chem. 267: 18210–18217.
65. Ida N., Hartmann T., Pantel J, Schroder J., Zerfass R., Forstl H., R. Sandbrink, Masters C. L., Beyreuther K. 1996. *Analysis of heterogeneous β A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive western blot assay.* J. Biol. Chem. 271: 22908–22914.
66. Motter R., Vigo-Pelfrey C., Kholodenko D., Barbour R., Johnson-Wood K., Galasko D, Chang L., Miller B., Clark C., Green R. 1995. *Reduction of β -amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease.* Ann. Neurol. 38: 643–648.
67. Mahley R. 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science. 240: 622–30.

68. Bales K., Dodart J., DeMattos R., Holtzman D., Paul S. E. 2002. *Apolipoprotein, amyloid, and Alzheimer disease*. Mol Interv. 2(6): 363 – 75.
69. Nathan B., Bellosta S., Sanan D., Weisgraber K., Mahley R., Pitas R. 1994. *Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on neuronal growth in vitro*. Science. 264: 850–2.
70. Fazekas F., Enzinger ., Ropele S., Schmidt H., Schmidt R., Strasser-Fuchs S. 2006. *The impact of our genes: Consequences of the apolipoprotein E polymorphism in Alzheimer disease and multiple sclerosis*. Journal of the Neurological Sciences 245: 35 – 39.
71. Gomez-Isla T., West H. L., Rebeck G. W., Harr S. D., Growdon J. H., Locascio J. J., et al. 1996. *Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease*. Ann Neurol. 39: 62-70.
72. Namba Y., Tomonga M., Kawasaki H., Otomo E., Okeda K. 1991. *Apolipoprotein E, immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease*. Brain Res. 541: 163-166.
73. Wisniewski T., Castamo E. M., Golabek A., Volgel T., Frangione B. 1994. *Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro*. Am J Pathol. 145: 1030-1035.
74. Lander E. S., Schork N. J. 1994. *Genetic dissection of complex traits*. Science. 265 (5181): 2037-48.
75. Wang C. K., Chen C. M., Chang C. Y., Laws S. M., Gandy S. E., Martins R. N. 2006. *Alpha-synuclein promoter RsaI T-to-C polymorphism and the risk of Parkinson's disease*. J. Neural Transm.
76. Heijmans B. T., Slagboom P. E., Gussekloo J., Droog S., Lagaay A. M., Kluit C., Knook D. L., Westendorp R. G. J. 2002. *Association of APOE epsilon2/epsilon3/epsilon4 and promoter gene variants with dementia but not cardiovascular mortality in old age*. Am. Journal of Medical Genetics. 107: 201–208.
77. Brown T.A. 2002. Genomes. Ed. BIOS. Segunda edición. USA.
78. Wisniewski K. E., Wisniewski H. M., Wen G.Y. 1985. *Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome*. Ann. Neurol. 17: 278–282.

79. Heston L.L., Mastri A.R., Anderson V.E., White J. 1981. *Dementia of the Alzheimer type. Clinical genetics, natural history, and associated conditions.* Arch Gen Psychiatry. 38(10): 1085-1090.
80. Tanzi R.E., Gusella J.F., Watkins P.C., Bruns G.A., St George-Hyslop P., Van Keuren M.L., Patterson D., Pagan S., Kurnit D.M., Neve R.L. 1987. *Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus.* Science. 235(4791): 880-884.
81. Corder E. H., Saunders A. M., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Small G. W., Roses A. D., Haines J. L., Pericak-Vance M. A. 1993. *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.* Science 261: 921–923.
82. Farrer L. A., Cupples L. A., Haines J. L., Hyman B., Kukull W. A., Mayeux R., Myers R. H., Pericak-Vance M. A., Risch N. van Duijn C. M. 1997. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. JAMA. 278: 1349–1356.
83. Engidawork E., Lubee G. 2001. *Protein expression in Down syndrome brain.* Amino Acids 21: 331–361.
84. Hirayama A., Horikoshi Y., Maeda M., Ito M., Takashima S. 2003. *Characteristic developmental expression of amyloid β 40, 42 and 43 in patients with Down syndrome.* Brain Dev. 25: 180–185.
85. Lv H, Jia L, Jia J. 2008. *Promoter polymorphisms which modulate PPA expression may increase susceptibility to Alzheimer's disease.* Neurobiology of Aging 29: 194–202.
86. Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Raux G., Le Meur N., Laquerriere A., Vital A., Dumanchin C., Feuillet S., Brice A., Vercelletto M. et al. 2006. *PPA locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy.* Nat. Genet., 38: 24–26.
87. Athan E. S., Lee J. H., Arriaga A., Mayeux R. P., Tycko B. 2002. *Polymorphisms in the promoter of the human PPA gene: functional evaluation and allele frequencies in Alzheimer disease.* Arch. Neurol. 59: 1793–1799.

88. Clarimon J., Bertranpetit J., Calafell F., Boada M., Tarraga L., Comas D. 2003. Joint analysis of candidate genes related to Alzheimer's disease in a Spanish population. *Psychiatr. Genet.* 13: 85–90.
89. Kentrup H., Becker W., Heukelbach J., Wilmes A., Schürmann A., Huppertz C., Kainulainen H., Joost H-G. 1996. *Dyrk, a Dual Specificity Protein Kinase with Unique Structural Features Whose Activity Is Dependent on Tyrosine Residues between Subdomains VII and VIII.* *The Journal Of Biological Chemistry.* 271 (7): 3488–3495.
90. Yang E. J., Ahn Y. S., Chung K. C. 2001. *Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells.* *Journal of Biology Chemistry.* 276 (43): 39819-39824.
91. Wegiel J., Kuchna I., Nowicki K., Frackowiak J., Dowjat K., Silverman W. P., Reisberg B., deLeon M., Wisniewski T., Adayev T., Chen-Hwang M-C., Hwang Y-W. 2004. *Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain.* *Brain Research* 1010: 69– 80.
92. Woods Y. L., Cohen P., Becker W., Jakes R., Goedert M., Wang X., Proud C. G. 2001. *The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2B ϵ at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212 : potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase.* *Biochemistry Journal.* 355: 609-615.
93. Ávila J., Lucas J. J., Pérez M., Hernández F. 2004. *Role of tau protein in both physiological and pathological conditions.* *Physiology Reviews.* 84 (2): 361-384.
94. Bielska A. A., Zondlo N. J. 2006. *Hyperphosphorylation of tau induces local polyproline II helix.* *Biochemistry.* 45 (17): 5527-5537.
95. Yoshida H., Hastie C. J., McLauchlan H., Cohen P., Goedert M. 2004. *Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK).* *Journal of Neurochemistry.* 90: 352–358.
96. Song W. J., Sullivan M. G., Legare R. D., Hutchings S., Tan X., Kufirin D., Ratajczak J., Resende I. C., Haworth C., Hock R. et al. 1999. *Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia.* *Nat. Genet.* 23: 166–175.
97. Speck N.A., Gilliland D.G. 2002. *Core-binding factors in hematopoiesis and leukemia.* *Nat Rev Cancer* 2: 502–513.

98. Theriault F. M., Roy P., Stifani S. 2004. *AML1/Runx1 is important for the development of hindbrain cholinergic branchiovisceral motor neurons and selected cranial sensory neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 10343-10348.
99. Theriault F. M., Nuthall H. N., Dong Z., Lo R., Barnabe-Heider F., Miller F. D., Stifani S. 2005. *Role for Runx1 in the Proliferation and Neuronal Differentiation of Selected Progenitor Cells in the Mammalian Nervous System*. The Journal of Neuroscience. 25 (8): 2050–2061.
100. Olson J. M., Katrina A. B., Dudek D. M. 2001. *The Amyloid Precursor Protein Locus and Very-Late-Onset Alzheimer Disease*. Am. J. Hum. Genet. 69:895–899.
101. Lendon C. L., Ashall F., Goate A. M. 1997. *Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics*. Jama. 277(10): 825-31.
102. Abramov A. Y., Canevari L. Duchen M. R. 2004. *Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase*. J Neurosci 24(2): 565-75.
103. Kimura R., Kamino K., Yamamoto M., Nuripa A., Kida T., Kazui H., Hashimoto R., Tanaka T., Kudo T., Yamagata H., Tabara Y, Miki T., Akatsu H., Kosaka K., Funakoshi E., Nishitomi K., Sakaguchi G., Kato A., Hattori H., Uema T., Takeda M. 2007. *The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between β -amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease*. Human Molecular Genetics. 16 (1): 15-23.
104. Ryoo S-R, Kyeong J. H., Radnaabazar C., Yoo J-J, Cho H-J., Lee H-W., Kim I-S., Cheon Y-H., Ahn Y-S., Chung S-H., Song W-J. 2007. *DYRK1A-mediated Hyperphosphorylation of Tau: A functional link between Down Syndrome and Alzheimer Disease*. The Journal of Biological Chemistry. 282 (48): 34850–34857.
105. Altafaj X., Dierssen M., Baamonde C., Martí E., Visa J., Guimerá J., Oset M., González J. R., Flórez J., Fillat C., Estivill X. 2001. *Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome*. Human Molecular Genetics. 10 (18): 1915-1923.
106. SantaCruz K., Lewis J., Spires T., Paulson J., Kotilinek L., Ingelsson M., Guimaraes A., DeTure M., Ramsden M., McGowan E., Forster C., Yue M., Orne J., Janus C.,

Mariash A., Kuskowski M., Hyman B., Hutton M., Ashe K. H. 2005. *Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function*. *Science*. 309 (5733): 476–481.

Páginas de internet:

- <http://www.fundacionalzheimeresp.org>
- <http://www.hipocampo.org>
- <http://las.perkinelmer.com/content/snps/genotyping.asp>
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=364048
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=2835740
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=4816501
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
- http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040597.pdf
- <http://www.infodoctor.org/infodoc/alzheimer/articulos/criteriosdsmiv.htm>