



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS ASOCIADOS CON
LA ELIMINACIÓN DE AMILOIDE-BETA EN PACIENTES MEXICANOS
CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARÍA ELIMAR TORRES OSSORIO



MÉXICO, D.F.

2016



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
VOCAL: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
SECRETARIO: VICTORIA CAMPOS PEÑA
1er SUPLENTE: MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES
2º SUPLENTE: LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Victoria Campos Peña

SUSTENTANTE:

María Elimar Torres Ossorio

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE	1
II. ÍNDICE DE TABLAS.....	3
III. ÍNDICE DE FIGURAS	4
IV. ABREVIATURAS Y SIGLAS	5
V. RESUMEN.....	6
VI. ABSTRACT.....	7
VII. ANTECEDENTES.....	8
7.1 La demencia a nivel mundial y en México.....	8
7.2 La enfermedad de Alzheimer.....	9
7.2.1 Placas neuríticas (PN)	12
7.2.2 Marañas neurofibrilares (MNF)	12
7.2.3 Diagnóstico	14
7.2.4 Genética del Alzheimer	15
7.3 Toxicidad del péptido amiloide beta.....	21
7.4 Enzimas involucradas en la eliminación de A β	22
7.4.1 Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE)	22
7.4.2 Enzima Degradadora de Insulina (IDE).....	24
7.5 Colesterol y demencia	27
7.5.1 24-dehidrocolesterol reductasa (DHCR24)	29
7.5.2 Protocadherina 11 (PCDH11)	30
7.6 Estudios de asociación	31
7.6.1 Análisis de ancestría.....	33
VIII. JUSTIFICACIÓN.....	34
IX. HIPÓTESIS.....	35
X. OBJETIVOS.....	35
Objetivo general.....	35
Objetivos particulares	35
XI. METODOLOGÍA	36
11.1 Grupos de estudio	36
11.1.1 Criterios de inclusión pacientes.....	36

11.1.2	Criterios de exclusión pacientes.....	36
11.1.3	Criterios de inclusión controles	36
11.1.4	Criterios de exclusión controles	37
11.2	Obtención de muestra, extracción y cuantificación de DNA.....	37
11.3	Técnica de estudio.....	37
11.4	Polimorfismos analizados	41
11.5	Análisis estadístico	42
XII.	RESULTADOS.....	45
12.1	Equilibrio de Hardy-Wienberg	45
12.2	Frecuencias alélicas	47
12.3	Frecuencias genotípicas	49
12.4	Combinaciones multiloci y Haplotipos.....	51
12.5	Desequilibrio de Ligamiento.....	53
12.6	Corrección por Ancestría	54
XIII.	DISCUSIÓN	56
XIV.	CONCLUSIÓN.....	61
XV.	REFERENCIAS	62
	ANEXOS	69
	ANEXO 1. EXTRACCIÓN DE DNA Y PLASMA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA (QUIAGEN).....	69
	ANEXO 2. COMBINACIONES ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS EVALUADOS	71
	ANEXO 3. COMBINACIONES ALÉLICAS POR GEN; ACE, IDE Y DHCR24	72
	ANEXO 4. DISTRIBUCIÓN DE LAS ANCESTRÍAS EN AMBOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	73
	ANEXO 5. PROPORCIONES DE ANCESTRÍA AMERINDIA EN EL GRUPO CASOS.....	74
	ANEXO 6. PROPORCIONES DE ANCESTRÍA AMERINDIA EN EL GRUPO CONTROL.....	75

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Etapas de la Enfermedad de Alzheimer: síntomas	8
Tabla 2. Edad y género de los grupos de estudio	37
Tabla 3. Mezcla de reacción.....	38
Tabla 4. Polimorfismos seleccionados para el estudio de asociación.....	42
Tabla 5. Equilibrio de Hardy-Wienberg en el grupo de pacientes con EA.....	46
Tabla 6. Equilibrio de Hardy-Wienberg en el grupo control	47
Tabla 7. Frecuencia de los alelos para los polimorfismos estudiados	48
Tabla 8. Comparación entre frecuencias alélicas	49
Tabla 9. Frecuencia de los genotipos para los polimorfismos estudiados	50
Tabla 10. Comparación entre frecuencias genotípicas.....	51
Tabla 11. Combinaciones multiloci para el grupo de pacientes con demencia tipo Alzheimer	52
Tabla 12. Haplotipos para el gen IDE	52
Tabla 13. Valores de D' y r ² para los genes ACE, IDE y DHCR24	53
Tabla 14. Análisis de resultados corregido por ancestría	55

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación del cerebro de un individuo normal con el de enfermedad de Alzheimer ..9	
Figura 2. Progresión de la acumulación de placas neuríticas..... 10	10
Figura 3. Etapas transentorrinales..... 11	11
Figura 4. Etapas límbicas. 11	11
Figura 5. Etapas isocorticales 11	11
Figura 6. Placa neurítica..... 12	12
Figura 7. Marañas neurofibrilares..... 13	13
Figura 8. Movimiento intracelular de la PPA β 16	16
Figura 9. Vías de procesamiento de la PPA β 17	17
Figura 10. Complejo y secretasa 19	19
Figura 11. Esquema de ApoE 20	20
Figura 12. Sistema renina-angiotensina 23	23
Figura 13. Vía de señalización de la insulina..... 25	25
Figura 14. Relación de la resistencia a la insulina con la EA..... 27	27
Figura 15. Influencia del colesterol en el procesamiento de la PPA β 28	28
Figura 16. Reacción que cataliza la enzima DHCR24 29	29
Figura 17. Clasificación de las protocadherinas 31	31
Figura 18. Curva de amplificación. 39	39
Figura 19. PCR en tiempo real usando sondas TaqMan [®] 40	40
Figura 20. Diagrama de dispersión..... 41	41
Figura 21. Esquema de desequilibrio de ligamiento para el gen DHCR24 54	54

IV. ABREVIATURAS Y SIGLAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
PN	Placas neuríticas
MNF	Marañas neurofibrilares
A β	Amiloide beta
MMSE	Mini mental state examination
CDR	Clinical dementia rating
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
PPA β	Proteína precursora de amiloide
RE	Retículo endoplásmico
ADAM	A Desintegrin and Metalloproteinase
BACE	B-site APP-cleavage enzyme
Nct	Nicastrina
PEN-2	Presenilin enhancer 2
Aph-1	Anterior pharynx-defective-1
ApoE	Apolipoproteína E
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
SRA	Sistema renina angiotensina
IDE	Enzima degradadora de insulina
IRS-1	Sustrato 1 del receptor de insulina
IRS-2	Sustrato 2 del receptor de insulina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKB	Proteína cinasa B
PDK-1	Proteína cinasa D
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3
DM	Diabetes mellitus
DHCR24	24-dehidrocolesterol reductasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
AIM	Marcadores Informativos de Ancestría
CKM	Creatine kinase, muscle
ROBO2	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 2
SAP30L	SAP30-like
CA10	Carbonic anhydrase X
DRD2	Dopamine receptor D2
DARC	Duffy blood group, atypical chemokine receptor 1

V. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia que se presenta con mayor prevalencia a nivel mundial. Consiste en la pérdida progresiva de la habilidad cognitiva debido al daño neuronal que ocurre por la presencia de dos tipos de lesiones a nivel cerebral, placas neuríticas formadas por depósitos extracelulares del péptido amiloide beta y marañas neurofibrilares debidas a la acumulación intracelular de la proteína de unión a microtúbulos tau en un estado hiperfosforilado. Diversos estudios han permitido la identificación de genes involucrados en su desarrollo; tal es el caso de la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano la cual se vio que está influenciada por la presencia de mutaciones en tres genes: presenilina 1 (PSEN1), presenilina 2 (PSEN2) y la proteína precursora de amiloide (PPAb), mientras que en la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío se ha visto como único factor de riesgo la presencia del alelo $\epsilon 4$ en el gen de la apolipoproteína E.

Debido a que se trata de una enfermedad multifactorial, es necesario investigar otros genes de susceptibilidad que pudiesen estar involucrados en su desarrollo. Estudios realizados en otras poblaciones han encontrado que la presencia de ciertos polimorfismos en el gen de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), enzima degradadora de insulina (IDE), 24-dehidrocolesterol reductasa (DHCR24) y protocadherina 11 (PCDH11) están presentes en mayor frecuencia en pacientes con demencia tipo Alzheimer. Sin embargo hasta el momento no existen estudios reportados en la literatura que evalúen este tipo de polimorfismos en la población Mexicana. Por tal motivo, se realizó la genotipificación de 3 polimorfismos localizados en el gen de la enzima convertidora de angiotensina, 4 en el gen de la enzima degradadora de insulina, 3 en el gen de la 24-dehidrocolesterol reductasa y 4 en el gen de la protocadherina 11 mediante PCR en tiempo real en un grupo de 94 pacientes con diagnóstico de demencia tipo Alzheimer y 100 sujetos sin diagnóstico de demencia como grupo control.

Los resultados obtenidos muestran que para el gen IDE la presencia del alelo C en el polimorfismo rs3758505, el genotipo homocigoto para el alelo A y el genotipo heterocigoto A/G en el polimorfismo rs4646954 confieren un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en la población Mexicana. Así mismo, se encontraron 6 combinaciones multiloci en los genes ACE, IDE y DHCR24 y un haplotipo en el gen de IDE presente en el grupo de pacientes con demencia tipo Alzheimer, lo cual podría indicar que su presencia conlleva a una mayor susceptibilidad de desarrollar la enfermedad.

VI. ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the type of dementia that occurs with the highest prevalence worldwide. A progressive loss of cognitive function occurs due to the neuronal damage caused by the presence of two types of lesions in the brain, neuritic plaques formed by extracellular deposits of amyloid- β protein and neurofibrillary tangles, which are intracellular accumulations of the microtubule associated protein Tau in a hyperphosphorylated state. Several association studies have allowed the identification of genes involved in its development; that is the case of early onset Alzheimer's disease (EOAD) which was seen is influenced by mutations in three genes, presenilin 1, presenilin 2 and the amyloid- β precursor protein while, the only risk factor associated with the late onset Alzheimer's disease (LOAD) is the presence of ϵ 4 allele in apolipoprotein E (ApoE).

Because it is a multifactorial disease, it is necessary to investigate other susceptibility genes that may be involved in its development. Studies in other populations have found that the presence of certain polymorphisms in the gene for angiotensin-converting enzyme (ACE), insulin-degrading enzyme (IDE), 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24) and protocadherin 11 (PCDH11) are present in Alzheimer's disease patients. Since there are no reported studies that assessed the presence of these polymorphisms in the Mexican population, we decided to genotype three polymorphisms located in the gene for ACE, four in IDE gene, three in the gene for DHCR24 and four in the PCDH11 gene by real-time PCR in a group of 94 patients diagnosed with Alzheimer-type dementia and 100 subjects without a diagnosis of dementia as the control group.

The results show that for the IDE gene the presence of the C allele in the rs3758505 polymorphism, the homozygous genotype A/A and the heterozygous genotype A/G in the rs4646954 polymorphism confer an increased risk in the development of AD in the Mexican population. Also, we found 6 multiloci combinations comprising ACE, IDE and DHCR24 genes and a haplotype in the IDE gene present in the case group, which could indicate that their presence may lead to an increased susceptibility of developing the disease.

VII. ANTECEDENTES

7.1 La demencia a nivel mundial y en México

La demencia, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud¹, es una serie de signos y síntomas causados por varias enfermedades cerebrales que afecta la memoria, el pensamiento, el comportamiento, la orientación, el lenguaje, la toma de decisiones y la habilidad de realizar actividades de la vida cotidiana. Aunque se presenta con mayor frecuencia en adultos mayores, no implica que sea parte normal del envejecimiento. En el año 2010 se estimó que a nivel mundial había 35.6 millones de personas que sufrían demencia, cifra que se verá duplicada cada 20 años. La demencia, es un problema de salud que afecta no sólo a la persona que la padece, ya que ocasiona la discapacidad del individuo y por lo tanto requiere de cuidados constantes por lo que tiene un alto impacto familiar. De acuerdo a los síntomas que se van presentando se pueden distinguir tres etapas: fase temprana, que se da en los primeros dos años; fase media, del segundo al quinto año y fase avanzada, del quinto año en adelante (Tabla 1).

Tabla 1. Etapas de la Enfermedad de Alzheimer: síntomas

Fase temprana	Fase media	Fase avanzada
-Olvidadizo con situaciones que acaban de ocurrir	-Muy olvidadizo con eventos recientes y con el nombre de personas	-Dificultad comprender lo que sucede a su alrededor
-Dificultad para encontrar palabras para comunicarse y en la toma de decisiones	-Puede necesitar ayuda en el cuidado personal	-No reconoce amigos, familiares u objetos
-Se desorienta en lugares que le son conocidos	-Incapaz de preparar sus alimentos, limpiar o ir de compras	-Dificultad para comer sin ayuda
-Pérdida de la noción del tiempo	-Cambios en su comportamiento como deambular, gritar o perturbaciones de sueño	-Necesita recibir asistencia para el cuidado personal
-Pérdida de interés en sus actividades o pasatiempos		-Cambios en su movilidad, puede no ser capaz de caminar por lo que necesita una silla de ruedas
-Cambio en su estado de ánimo como depresión o ansiedad		-Se intensifican los cambios en su comportamiento e incluir agresión y agitación no verbal

Fuente: OPS. 2013.¹

En México, se estima que cerca de 800 mil personas sufren de algún tipo de demencia.² En el año 2014 se consolidó el Plan de Acción Alzheimer y otras demencias en el cual participan asociaciones civiles e Institutos de Salud, con la finalidad de promover una concientización en la enfermedad al favorecer el acceso a la información, la capacitación y la creación de un modelo de atención integral que culmine en mejorar la calidad de vida del paciente.

7.2 La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia en las personas de edad avanzada, se trata de una pérdida progresiva de la habilidad cognitiva y funcional del paciente así como cambios en su conducta.³ En la enfermedad de Alzheimer el cerebro es el órgano que se ve afectado, principalmente en la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y las áreas de asociación cortical. A nivel macroscópico, ocurre una pérdida del volumen cerebral por el ensanchamiento de los surcos, los ventrículos donde se encuentra el líquido cefalorraquídeo se agrandan, hay daño en las neuronas localizadas en el hipocampo con lo que se compromete la memoria a corto plazo, y hay pérdida en la capacidad de juicio y lenguaje por la extensión del daño a la corteza, que es la parte más exterior del cerebro (Figura 1).

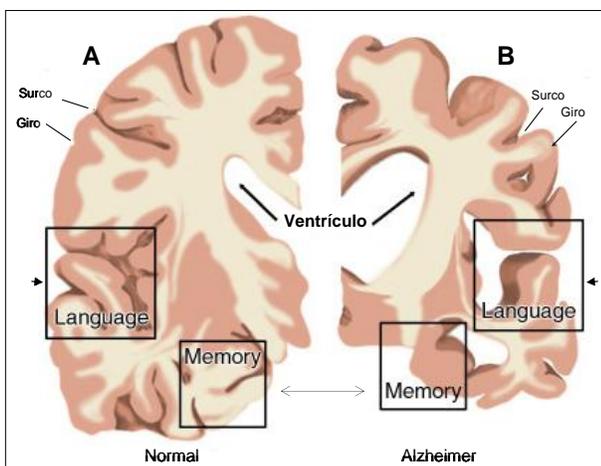


Figura 1. Comparación del cerebro de un individuo normal con el de enfermedad de Alzheimer. (A) Del lado izquierdo se muestra el cerebro de un individuo normal y (B) del lado derecho el de un individuo con EA. Se observa una disminución del volumen cerebral; en recuadros se muestran las áreas que se ven afectadas al extenderse el daño. Fuente: Campos-Peña, V, Meraz-Ríos, MA. 2006.⁴

A nivel microscópico se caracteriza por la presencia de dos tipos de lesiones representativas, que son las placas neuríticas (PN) y las marañas neurofibrilares (MNF).⁵ En 1991 Braak & Braak⁶ realizaron un estudio para conocer la distribución de estas lesiones en tejido cerebral, ellos observaron que los depósitos de amiloide se localizaban principalmente en la corteza cerebral pudiéndose diferenciar sólo tres estadios de acuerdo a su densidad, en A, B y C. Por el contrario, la distribución de las marañas neurofibrilares seguía un patrón bien definido, por lo que fue posible clasificar su evolución en seis etapas: I, II, III, IV, V y VI (Ver detalles más adelante).

En la corteza, la neocórtex es el sitio principal donde se acumulan los depósitos del péptido A β . Con respecto a su distribución, el estadio A se caracteriza por la presencia de regiones poco densas en la neocórtex principalmente en la porción basal de los lóbulos frontal, temporal y occipital. En el estadio B, la densidad de los depósitos de amiloide está presente en casi todas las áreas de asociación en la neocorteza y en el estadio C, hay depósitos de amiloide en las áreas primarias de la neocorteza (Figura 2).⁶

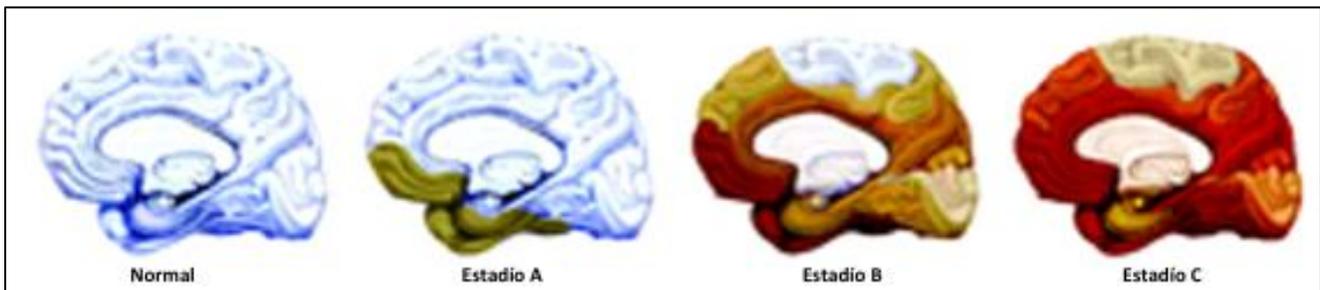


Figura 2. Progresión de la acumulación de placas neuríticas. En el estadio A se observan depósitos en las porciones basales de la isocórtex, en el estadio B los depósitos de amiloide se localizan en todas las regiones de asociación en la isocórtex además de que el área de formación hipocampal está medianamente comprometida; en el estadio C los depósitos de A β se observan en todas las áreas de la isocórtex incluidas el área sensorial y motora.

Debido a que la distribución de las MNF sigue un patrón definido los estadios pueden agruparse de acuerdo al área de inicio, el estadio I y II inicia en la región transentorrinal, el estadio III y IV tiene su inicio en la región que comprende el sistema límbico y, en los estadios V y VI además se ve afectada la isocórtex. Los estadios I y II incluyen la presencia de degeneración neurofibrilar en la corteza entorrinal, la corteza transentorrinal y la región CA1 subicular al hipocampo (Figura 3). En los estadios III y IV se observa, además,

degeneración neurofibrilar en el sistema límbico (Figura 4). Finalmente, en los estadios V y VI, la degeneración neurofibrilar está presente también en la neocórtex (Figura 5).⁶

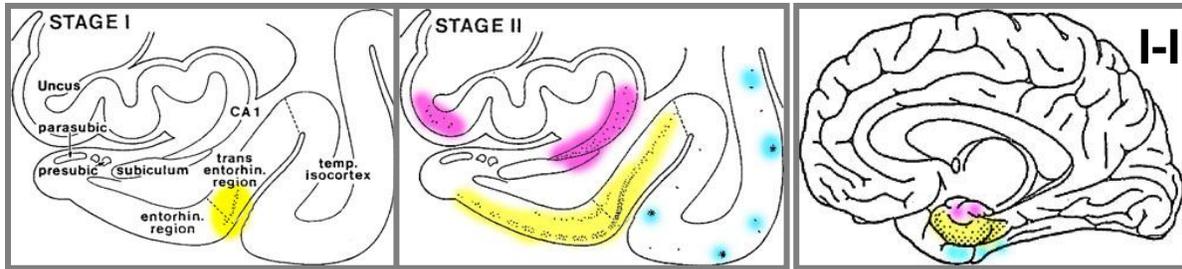


Figura 3. Etapas transentorrinales. (I) Presencia de MNF en células que residen dentro de la región de la corteza transentorrinal (color amarillo), posteriormente (II) el daño se acentúa en la corteza transentorrinal, extendiéndose a la corteza entorrinal y a la región CA1/CA2 del hipocampo (color morado).

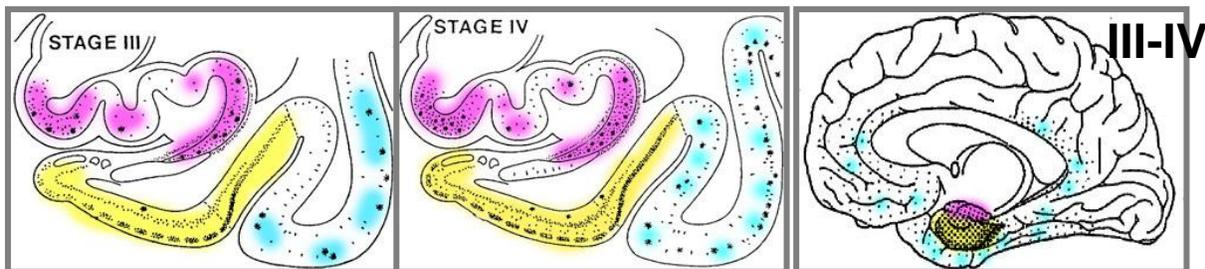


Figura 4. Etapas límbicas. (III y IV) El daño observado en las etapas transentorrinales se acentúa, además se extiende hacia áreas del sistema límbico (color azul claro).

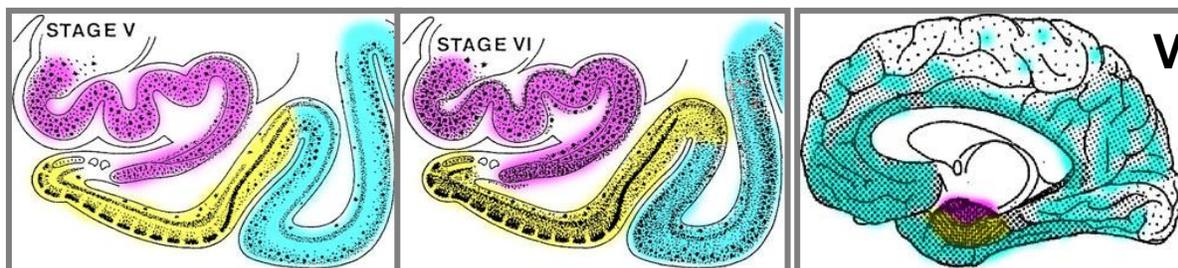


Figura 5. Etapas isocorticales. (V y VI) Hay destrucción severa y masiva de áreas del sistema límbico, además ahora se ven involucradas áreas de asociación cortical. Fuente: modificado de Braak, H., E. Braak. 1995.⁷

7.2.1 Placas neuríticas (PN)

Se localizan en la corteza e hipocampo de individuos afectados, presentan una conformación esférica e inclusive pueden alcanzar 200 μm de diámetro (Figura 6). Se trata de depósitos extracelulares cuyo principal componente es un péptido de 4 kDa conocido como amiloide beta ($\text{A}\beta$).³ El péptido $\text{A}\beta$ es generado a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide beta (PPA β), que da lugar a fragmentos de 39 a 43 aminoácidos dependiendo del sitio de corte de γ secretasa.⁸ La mayoría del péptido amiloide beta que se encuentra formando las placas corresponde a aquel que cuenta con 42 aminoácidos ($\text{A}\beta_{42}$), debido a que es más propenso a agregarse; sin embargo, también existe en conjunto amiloide beta de 40 aminoácidos ($\text{A}\beta_{40}$) el cual se produce de forma más abundante por las células.⁹

El péptido amiloide beta puede encontrarse en forma de monómero, dímero, oligómero o en fibras los cuales comienzan a agregarse adoptando una estructura en forma de hoja β plegada. Alrededor de los núcleos de las placas de $\text{A}\beta$ hay presencia de neuritas distróficas, microglía activada y astrocitos.

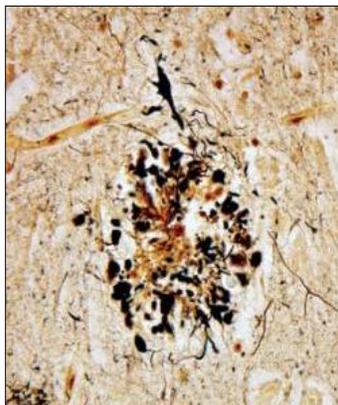


Figura 6. Placa neurítica. Fuente: modificado de Perl, D.P. 2010.¹⁰

7.2.2 Marañas neurofibrilares (MNF)

Son el resultado de la agregación anormal de material proteico al interior de las neuronas ocupando poco a poco el espacio intracelular³, el principal componente es la proteína tau (Figura 7). Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MAP) cuyo gen se localiza en el

brazo largo del cromosoma 17. En las neuronas, se localiza principalmente en el axón.¹¹ Existen 6 principales isoformas en el ser humano que presentan dos dominios, el dominio de proyección que corresponde al N-terminal que cuenta con una región acídica y otra rica en prolina y el dominio C-terminal, que cuenta con varios dominios repetidos que constituyen el dominio de unión a microtúbulos (MTBD).¹²

Es una proteína estable, altamente soluble y que presenta una estructura primaria que permite que sufra modificaciones post-traduccionales tales como glicación, nitración, oxidación o fosforilación, siendo esta última el principal mecanismo asociado con su agregación anormal.

La fosforilación de tau es el mecanismo mediante el cual se regula su función, en ella participan cinasas como la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3 β) o la ciclina dependiente de cinasa 5 (cdk5), y fosfatasas como PP2A, PP2B ó PP1.¹³ La unión de tau al microtúbulo (MT) depende de su grado de fosforilación y desfosforilación, en las células existen diversas pozas de la proteína con diferentes estados de fosforilación, la mayor parte de estas proteínas se encuentran fosforiladas y sólo una pequeña porción se encuentra unida a los microtúbulos. La fosforilación de Tau, ocurre preferentemente en los residuos de serina, treonina y prolina.¹⁴ La hiperfosforilación de la proteína conlleva a que disocie del MT favoreciendo su acumulación y posterior agregación en la forma de monómeros, dímeros/trímeros, filamentos helicoidales apareados (PHF) y finalmente, MNF.

Esta proteína además de promover el ensamblaje y estabilidad de los MT participa en el crecimiento de las neuritas, el transporte en el axón, la transducción de señales e interactúa con la membrana plasmática y el citoesqueleto.¹⁵

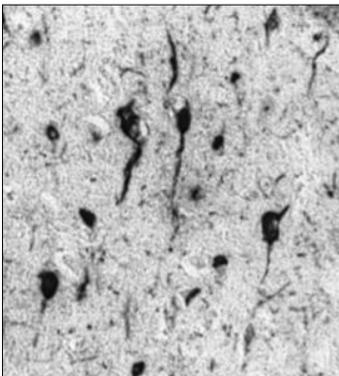


Figura 7. Marañas neurofibrilares. Fuente: modificado de Bennett, D.A., et al. 2004.¹⁶

7.2.3 Diagnóstico

Actualmente, el diagnóstico definitivo de la EA es el neuropatológico. Éste, consiste en un examen macroscópico y microscópico del cerebro. A nivel macroscópico se observa la morfología de las estructuras cerebrales donde habrá una disminución del volumen cerebral, el adelgazamiento de la corteza cerebral, el agrandamiento de los ventrículos así como la reducción del hipocampo (Figura 1) y a nivel histopatológico, se realiza la tinción de tejido cerebral para observar las lesiones características de la enfermedad, PN y MNF (Figuras 6, 7).

El diagnóstico clínico se realiza considerando el expediente clínico del paciente, pruebas neuropsicológicas y pruebas de neuroimagen.

Las pruebas neuropsicológicas involucran la realización de una entrevista con preguntas estructuradas al paciente y algún familiar directo. Las preguntas tienen asignado una puntuación cuya sumatoria dará a conocer el estado mental del sujeto, ejemplos de estas pruebas son:

- MMSE.¹⁷ La escala de puntuación va de ≤ 9 a 30. Un puntaje ≤ 9 significa que el individuo tiene un deterioro cognitivo grave mientras que 30 puntos es que tiene buena salud mental.
- CDR.¹⁸ Es una escala global específica para identificar la demencia tipo Alzheimer cuyos valores van de cero a tres; el valor de cero significa que el sujeto no presenta ningún deterioro mientras que un valor de tres implica que presenta deterioro severo.
- NINCDS-ADRDA.¹⁹ En 1984 un grupo de investigadores se reunió con la finalidad de conjuntar criterios que llevasen al diagnóstico de la EA, para ello se consideró la historia clínica del paciente, el examen físico, pruebas neuropsicológicas y ensayos de laboratorio.

Las técnicas de neuroimagen²⁰ permiten el estudio del cerebro humano a nivel funcional y estructural. Las pruebas que se utilizan con mayor frecuencia son la resonancia magnética nuclear (RMN), la tomografía por emisión de positrones (PET), la tomografía computada (TC) y la tomografía computarizada por emisión de fotones simples (SPECT).

7.2.4 Genética del Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer se puede clasificar en dos tipos: familiar o de inicio temprano (Early Onset Alzheimer Disease, EOAD) y esporádico o de inicio tardío (Late Onset Alzheimer Disease, LOAD).

7.2.4.1 Alzheimer de inicio temprano

Ocurre en personas de edad menor a 65 años siendo del 1 al 5 por ciento de todos los casos. Presenta una herencia Mendeliana autosómica dominante. Se ha asociado con la presencia de mutaciones en tres genes que son presenilina 1 (PSEN1), presenilina 2 (PSEN2) y la proteína precursora de amiloide beta (PPA β). La presencia de estas mutaciones, está asociada con un incremento en la producción del péptido A β ₄₂.²¹

- Presenilina 1 (PSEN1)

Fue descubierta en 1995. Su gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 14. Es una proteína de 50-55 kDa que tiene nueve dominios transmembranales con un loop entre el sexto y séptimo. La enzima es activa en un amplio rango de pH pero sus condiciones óptimas son a pH neutro o ligeramente ácido.²² Se encuentra como un heterodímero debido a que sufre una endoproteólisis por una proteasa referida como “presenilinas” que da lugar a dos fragmentos asociados, C-terminal (CTF) y N-terminal (NTF).²³ Cada uno de los fragmentos dona un aspartato lo que le da la actividad al complejo y secretasa.²⁴

- Presenilina 2 (PSEN2)

Fue descubierta en 1995 poco después del hallazgo de PSEN1. Su gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 1. Es homólogo de la presenilina 1.²⁵

- Proteína precursora de amiloide (PPA β)

Fue descubierta en 1987. Es una proteína membranal de tipo 1 cuyo gen se encuentra en el cromosoma 21. Cuenta con un dominio extracelular hidrofílico conformado por el N-terminal, un único dominio transmembranal hidrofóbico y un dominio citoplásmico que corresponde al C-terminal.²⁰ Su síntesis ocurre en el retículo endoplásmico (RE) tras lo cual una pequeña

porción, aproximadamente el 10%, se localiza en la membrana plasmática y el restante en el aparato de Golgi y la red trans Golgi (Figura 8).²⁶

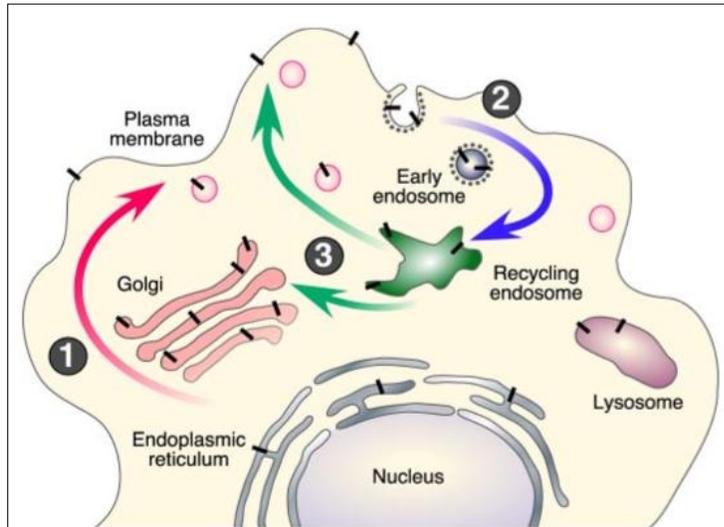


Figura 8. Movimiento intracelular de la PPA β . Moléculas nuevas de la PPA β (barras negras) maduran a través de su paso del RE al aparato de Golgi, una vez que la PPA β llega a la superficie puede ser rápidamente internalizada para ser transportada de nuevo a la superficie celular o para ser degradada en los lisosomas. El procesamiento no amiloidogénico ocurre principalmente en la superficie celular donde alfa secretasa está presente mientras que el procesamiento por la vía amiloidogénica requiere que la PPA β sea internalizada en vesículas endosomales donde se encontrará con beta y gamma secretasa. Fuente: Thinakaran, G., E.H. Koo. 2008.²⁶

Corresponde a un grupo heterogéneo de polipéptidos que sufren modificaciones postraduccionales como la adición de azúcares, grupos sulfato o fosfato. Existen ocho isoformas que contienen de 365 a 770 aminoácidos, sin embargo, las isoformas que contienen la secuencia que codifica para el péptido A β sólo se encuentran en las isoformas que contienen 751, 770 y 695 residuos de aminoácidos.²⁷ Las dos primeras se expresan en células no neuronales tales como aquellas pertenecientes al músculo, riñón o pulmón; mientras que la última se expresa en mayor proporción en las neuronas.²⁸

7.2.4.1.1 Procesamiento de la proteína precursora de amiloide

Si bien la mayoría de la PPA β es degradada en el retículo endoplásmico, es durante su transporte hacia la membrana celular cuando sufre cortes por tres enzimas proteolíticas denominadas secretasas. Existen dos vías mediante las cuales se lleva a cabo su procesamiento (Figura 9).

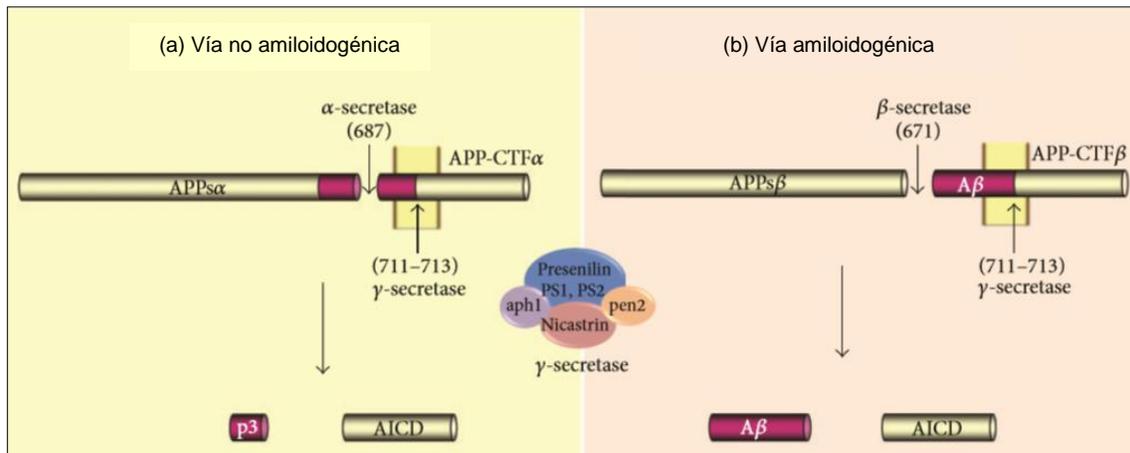


Figura 9. Vías de procesamiento de la PPAβ. Existen dos vías mediante las cuales ocurre el procesamiento, (a) la vía no amiloidogénica donde participan alfa y gamma secretasa, y (b) la vía amiloidogénica donde participan beta y gamma secretasa. Fuente: modificado de Meraz-Ríos, M.A. 2014.²⁹

1. Vía no amiloidogénica

En esta vía participan α y γ secretasa. La acción de α secretasa sobre la PPA β genera un péptido soluble, sPPA- α , y un fragmento, C83, que queda retenido en la membrana. Posteriormente, γ secretasa actúa sobre C83 para dar lugar a un fragmento extracelular de 3 kDa, p3, y un fragmento intracelular denominado CTF γ .³⁰ La acción de α secretasa sobre la PPA β requiere que se encuentre anclada a la membrana celular.

- α secretasa

La actividad de α secretasa se ha asociado con ciertos miembros de la familia ADAM³¹ entre los que destacan ADAM10, ADAM17 y ADAM9.

2. Vía amiloidogénica

En esta vía participan β y γ secretasa. La PPA β que no es procesada por α secretasa es internalizada en vesículas, donde β secretasa se localiza y actúa uniéndose a la PPA β dando lugar a un fragmento soluble, sPPA- β y un fragmento anclado a la membrana, C99.³² La formación de amiloide beta ($A\beta$) tiene lugar debido a la acción de γ secretasa sobre C99.

- β secretasa

BACE1 (β -site APP-cleavage enzyme) es la principal β secretasa.³³ Se localiza principalmente en la red trans Golgi y en los endosomas. Su síntesis ocurre en el RE, tras lo cual es transportada a la membrana plasmática; al igual que la PPA β es internalizada en vesículas endosomales que le proporcionan un ambiente ácido necesario para su actividad óptima.³⁰

- γ secretasa^{34,35}

Está conformada por cuatro proteínas transmembranales de tipo 1 que son: presenilina 1 ó 2 (PSEN1, PSEN2), nicastrina (Nct), PEN-2 (presenilin enhancer 2) y Aph-1 (anterior pharynx-defective-1) (Figura 10). El ensamblaje del complejo inicia en el RE, donde primeramente Nct y Aph-1 se unen formando un complejo estable al que posteriormente se asocia PSEN y PEN-2.

- Presenilina

Su estructura consiste en nueve dominios transmembranales. Se le considera el sitio activo del complejo debido a que entre en sexto y séptimo dominio se localizan los aspartatos, los cuales son necesarios para el procesamiento proteolítico.

- Nicastrina (Nct)

Es una glicoproteína de 709 aminoácidos cuyo dominio transmembranal es el sitio de interacción entre PSEN y Aph-1. Cuenta con un dominio intracelular C-terminal corto y un dominio extracelular N-terminal que actúa como el sitio receptor.

- PEN-2

Es una proteína de 101 aminoácidos con dos dominios transmembranales de los cuales el N-terminal interactúa con PSEN mientras que el C-terminal activa y favorece la proteólisis de PSEN. Permite la salida de Nct del retículo endoplásmico al aparato de Golgi, donde ocurre su maduración.

- Aph-1

Es una proteína con siete dominios transmembranales, un motivo conservado en el cuarto dominio transmembranal permite la interacción intermolecular entre PSEN y PEN-2. Estabiliza a PSEN junto con Nct.

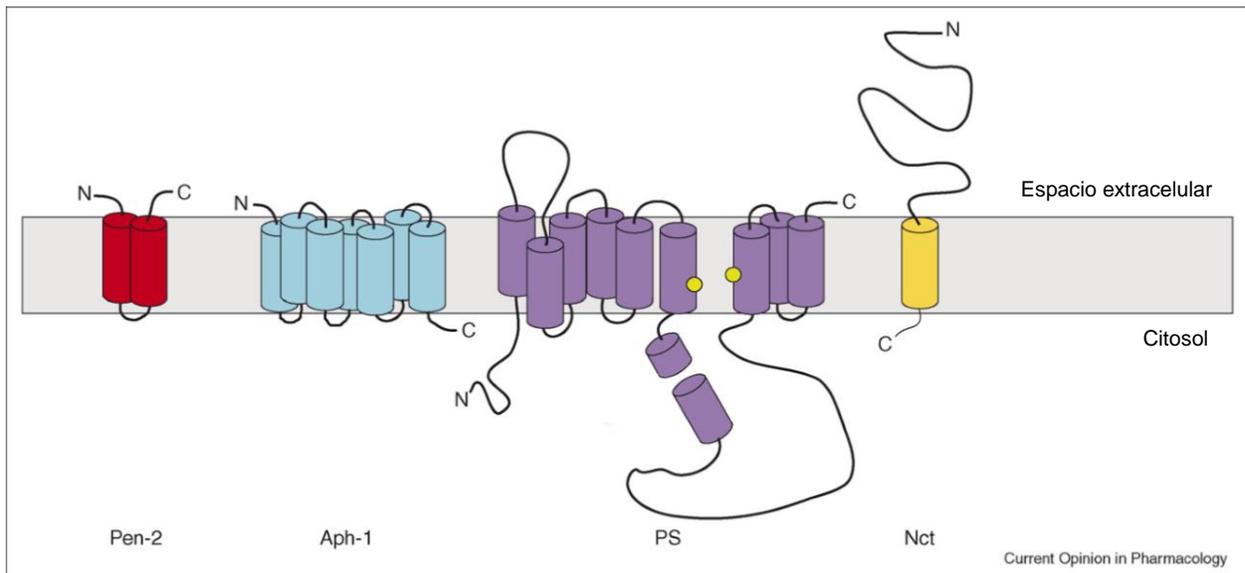


Figura 10. Complejo y secretasa. Conformado por cuatro proteínas transmembranales que son presenilina 1 ó 2, Nicastrina, PEN-2 y Aph-1. Fuente: modificado de Lundkvist, J., J. Näslund. 2007.³⁶

7.2.4.2 Alzheimer de inicio tardío

Representa del 85 al 90 por ciento de los casos que se presentan a nivel mundial en la población mayor de 65 años.³⁷ El principal factor de riesgo genético asociado es la presencia del alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (ApoE).

- Apolipoproteína E

Es una proteína de 33 kDa y 299 aminoácidos cuyo gen se localiza en el cromosoma 19. Existen tres isoformas que se diferencian por un cambio de aminoácido en los residuos 112 y 158; ApoE2 tiene cisteína en ambas posiciones, ApoE3 tiene cisteína en el sitio 112 y arginina en el 158 y por el contrario, ApoE4 tiene arginina en ambas. Cuenta con dos dominios, el N-terminal donde se localiza la región de unión a receptor y la C-terminal donde se encuentra la región de unión a lípidos (Figura 11). Cada isoforma es metabólicamente

diferente y difieren una de otra en su afinidad por las partículas lipoproteínicas, así como por su unión a los receptores lipoproteínicos de baja densidad.

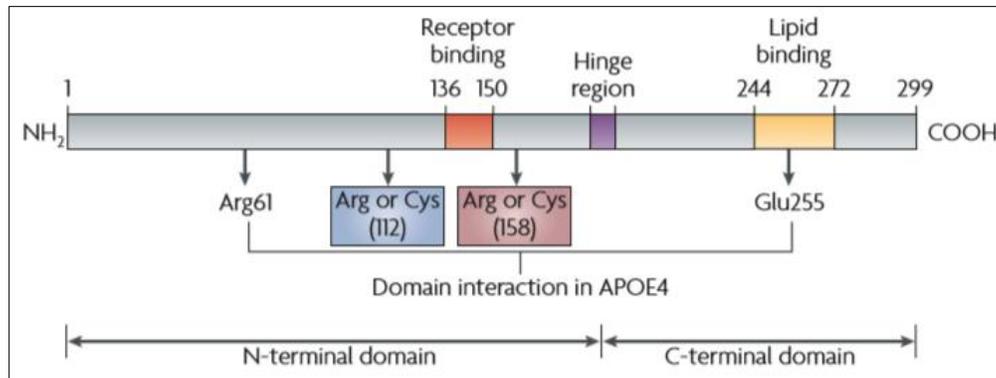


Figura 11. Esquema de ApoE. Fuente: Bu, G. 2009.³⁸

Se expresa en el hígado y en el cerebro, sitio donde es producida por los atrociitos, seguido por la microglía y bajo ciertas condiciones por las neuronas.³⁹ Regula el transporte de lípidos y colesterol mediante la unión a receptores en la membrana celular pertenecientes a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR).⁴⁰

La presencia de una copia del alelo $\epsilon 4$, incrementa tres veces el riesgo de presentar la enfermedad de Alzheimer; mientras que la presencia de ambas copias incrementa el riesgo de la enfermedad hasta doce veces.⁴¹ ApoE3 es la isoforma más común mientras que ApoE2 es la isoforma menos frecuente, ya que se presenta del 1 al 5 por ciento de la población.

Un metabolismo anormal de lípidos está relacionado con la EA debido a que el incremento intracelular de colesterol inhibe la actividad de α secretasa favoreciendo la actividad de β y γ secretasas.³⁷ El paso que marca la formación de placas neuríticas es el cambio de conformación del A β de α hélice, que es soluble, a hoja β plegada; estudios *in vivo* han demostrado que ApoE se asocia con las placas neuríticas ya que se une más fácilmente a la conformación β .⁴²

7.3 Toxicidad del péptido amiloide beta

La acumulación de A β se debe a un desequilibrio entre su formación y eliminación. El efecto tóxico del péptido A β se debe a su conversión de monómero a oligómero. Entre los mecanismos de toxicidad que se han descrito son estrés oxidativo, disfunción de las sinapsis, interacción con receptores como NMDA y AMPA, disfunción mitocondrial y la interacción con las membranas.⁴³

- Estrés oxidativo

El cerebro es vulnerable de sufrir estrés oxidativo por su alto contenido lipídico. El péptido amiloide beta es capaz de reducir el Cu²⁺ y Fe³⁺ a Cu⁺ y Fe²⁺ debido a que cuenta con sitios de unión a metales, principalmente Cu²⁺, en la región que comprende los primeros 15 aminoácidos debido a la presencia de los aminoácidos histidina en las posiciones 6, 13 y 14 además de tirosina en la posición 10. Esto permite, que estos iones reaccionen con el oxígeno molecular generándose el anión superóxido ($\cdot O_2^-$) el cual puede reaccionar con ambos hidrógenos del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Así mismo, el peróxido de hidrógeno al reaccionar con otros iones metálicos genera el radical hidroxilo ($\cdot OH$) que puede sustraer protones de lípidos y proteínas.

- Disfunción mitocondrial

Se ha reportado que el A β puede ingresar a la mitocondria a través de los transportadores de membrana mitocondrial (TOM) afectando la integridad del citocromo C y de otras enzimas del ciclo de Krebs. También, inhibe la producción de ATP.

- Interacción con membranas

El péptido A β se une con gran afinidad a las membranas ocasionando un incremento intracelular de Ca²⁺ al favorecer la formación de poros o canales iónicos que facilitan su ingreso a la célula.

7.4 Enzimas involucradas en la eliminación de A β

La concentración fisiológica del péptido A β es mantenida por el balance entre la regulación del procesamiento proteolítico de la PPA β que resulta en la formación de A β , su eliminación y transporte a través de la barrera hematoencefálica, su degradación proteolítica y por la capacidad de ciertas proteínas de unirse al péptido A β .⁴⁴ En el cerebro, las células de la microglía son las responsables de fagocitar A β y liberar enzimas que degradarán el péptido A β . Estudios han mostrado que son capaces de internalizar y degradar formas fibrilares (fA β) y solubles (sA β) de A β .⁴⁵ Las formas solubles de A β son eliminadas mediante su transporte a través de la barrera hematoencefálica a la circulación por el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (LRP1)⁴⁶, este mecanismo es facilitado o inhibido por su unión a una proteína transportadora como ApoE, ApoJ o albúmina.⁴⁷ Así mismo, el A β puede sufrir degradación proteolítica por una serie de proteasas cuya actividad depende de su afinidad por el A β , su pH óptimo y su localización celular.⁴⁸ En la microglía, la principal proteasa involucrada en la degradación de A β a nivel intracelular es neprilisina (NEP) mientras que a nivel extracelular es la enzima degradadora de insulina (IDE).

7.4.1 Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE)

Esta enzima pertenece al sistema renina-angiotensina (SRA), su función principal es la regulación de la presión sanguínea y el balance de fluidos y sales en el cuerpo. La enzima renina, liberada a la circulación por las células del aparato yuxtaglomerular del riñón actúa sobre el dominio N-terminal del angiotensinógeno para convertirlo en angiotensina I (Ang I). Posteriormente, la enzima convertidora de angiotensina cataliza la conversión del péptido de diez aminoácidos angiotensina I al de ocho aminoácidos angiotensina II (Ang II) mediante la escisión de dos péptidos en la región C-terminal.⁴⁹ Así mismo, la acción de la aminopeptidasa A sobre Ang II da lugar a la formación del heptapéptido angiotensina III (Ang III) mientras que la acción de la aminopeptidasa N sobre Ang III da lugar al hexapéptido angiotensina IV (Ang IV) (Figura 12).

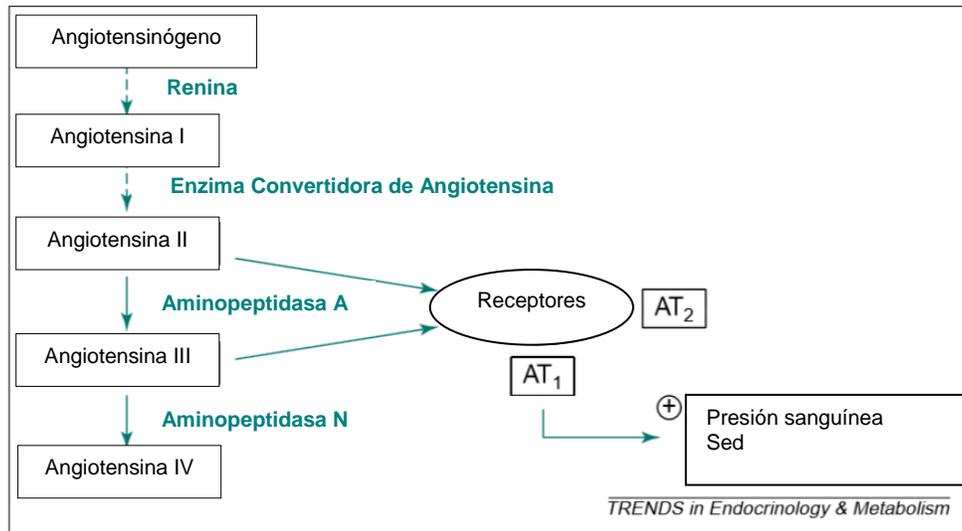


Figura 12. Sistema renina-angiotensina. Fuente: modificado de Reaux, A., M.C. Fournie-Zaluski, C. Llorens-Cortes. 2001.⁵⁰

La unión de la Ang II a sus receptores AT₁ ó AT₂ tiene un efecto vasoconstrictor, regulándose así la presión sanguínea.

En los seres humanos existen dos isoformas de la enzima, ambas codificadas por un gen en el cromosoma 17, que son la somática (sACE) y la germinal (gACE). sACE es una proteína transmembranal con un dominio citosólico C-terminal, un dominio transmembranal hidrofóbico y un dominio extracelular que cuenta con dos regiones homólogas C- y N-terminal las cuales cuentan con un sitio de unión a zinc; se expresa principalmente en células endoteliales.⁵¹

Con respecto a la EA, se ha planteado que el dominio responsable de degradar el péptido amiloide beta es el N-terminal.⁵² Actualmente, se han reportado 78 polimorfismos en el gen que codifica para esta enzima, que se encuentran asociados con el desarrollo de la EA, siendo el más estudiado un polimorfismo de inserción/delección correspondiente a la presencia o ausencia de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 de este gen.⁵³ Estudios han señalado que el genotipo que contiene al alelo de inserción parece estar asociado con la EA, mientras que el genotipo homocigoto para el alelo de delección como protector.^{54,55,56} Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que esta enzima es capaz de unirse a Aβ₄₀ y Aβ₄₂ favoreciendo su degradación.^{57,58} Además, su actividad parece estar incrementada en aquellos pacientes con EA en comparación con los individuos control.^{59,60}

7.4.2 Enzima Degradadora de Insulina (IDE)

Es una enzima de aproximadamente 110 kDa que requiere un tiol (-SH) y un catión bivalente Zn^{2+} para su actividad como proteasa. El gen que la codifica tiene 120 kb y se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10. Cuenta con un sitio activo conformado por una secuencia HEXXH donde ambas histidinas (H) coordinan la unión con el átomo de zinc mientras que el glutamato (E) tiene función catalítica.⁶¹ Se localiza principalmente en el citosol pero también en los endosomas, peroxisomas y la superficie celular.⁶² Su actividad de proteasa la ejerce preferentemente sobre péptidos que tienden a formar fibrillas de amiloide en forma de hoja β plegada como insulina, $A\beta$, amilina, factor natriurético atrial y calcitonina.

La enzima se encuentra como un monómero formado por dos dominios de ~50 kDa, IDE-N e IDE-C. Al unirse ambos dominios se forma una cavidad que rodea a los sustratos y no permite la entrada o salida de los mismos, excluyendo aquellos péptidos que tengan más de ~70 aminoácidos. Al interior de la cavidad, del lado del dominio IDE-N, se localiza el sitio activo. Además, IDE-N posee un exosito donde la región N-terminal de sus ligandos queda anclada. Una vez que se da el reconocimiento enzima-sustrato, los sustratos sufren un cambio conformacional de alfa hélice a hoja beta con lo que interaccionan no covalentemente con el sitio activo y el exosito. Posteriormente, una vez al interior de la cavidad la región N-terminal del sustrato es anclada al exosito permitiéndose el correcto posicionamiento de la región C-terminal al sitio catalítico.⁶³ La actividad enzimática de esta enzima ocurre en un rango de pH de 6.0 a 8.5.

El principal sustrato de esta enzima es la insulina. La insulina es una hormona de 51 aminoácidos sintetizada y secretada por las células β pancreáticas en los islotes de Langerhans como consecuencia de un incremento de glucosa en el torrente sanguíneo. El cerebro es el principal consumidor de glucosa, por lo que requiere que ésta sea transportada a través de la barrera hematoencefálica mediante su unión a las proteínas transportadoras de glucosa (GLUT).

El receptor de insulina⁶⁴ es un heterotetrámero con actividad de tirosina cinasa formado por dos subunidades extracelulares denominadas α y dos subunidades transmembranales denominadas β , ambas unidas por puentes disulfuro. En el cerebro se localizan en la corteza

cerebral, hipocampo, hipotálamo y bulbo olfatorio. La unión de la insulina a la subunidad α induce un cambio conformacional que resulta en la activación de la subunidad β al autofosforilarse los residuos de tirosina.⁶⁵ Este evento propicia que se fosforilen algunos miembros de la familia de proteínas IRS, entre los que destacan el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) y el sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2). La unión de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) al IRS-1 conlleva a su activación. PI3K convierte el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) el cual indirectamente activa a la proteína cinasa B (PKB). Cuando PKB está unida a PIP₃ es fosforilada y activada por la proteína cinasa D (PDK-1). Una vez activa, PKB (también llamada Akt) ingresa al citoplasma donde inactiva a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) al fosforilar los residuos de serina 21 en la isoforma alfa y la serina 9 en la isoforma beta. GSK3 α aumenta los niveles del péptido A β al favorecer la actividad de γ secretasa sobre la PPA β mientras que GSK3 β es la principal cinasa responsable de la hiperfosforilación de tau.⁶⁶ El principal sustrato de la GSK3 es la glucógeno sintasa (GS), esta enzima cataliza el paso final de la síntesis de glucógeno. La fosforilación de la enzima glucógeno sintasa por GSK3 inhibe la síntesis de glucógeno mientras que la inactivación de GSK3 por PKB/Akt origina que la glucosa sea almacenada como glucógeno (Figura 13). La insulina a nivel cerebral tiene beneficios en la memoria y el aprendizaje.

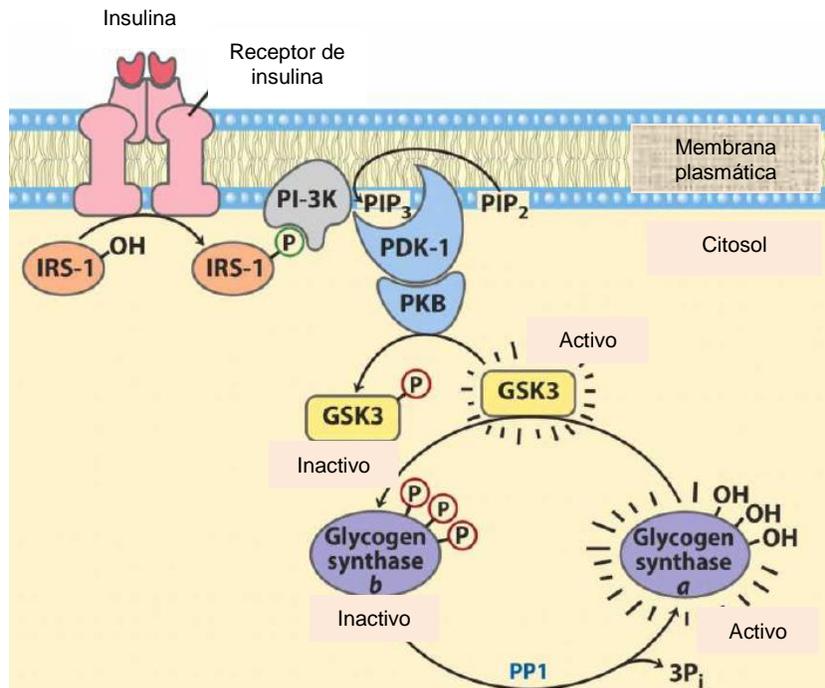


Figura 13. Vía de señalización de la insulina

Debido a que la acumulación progresiva de A β es una característica invariable de la EA, su baja eliminación puede ser un factor de riesgo a desarrollar la enfermedad en algunos sujetos. IDE es la principal proteasa involucrada en la degradación del péptido A β a nivel extracelular; sin embargo, sólo es capaz de degradarlo si se encuentra en forma de monómero. Kurochkin y Goto⁶⁷ demostraron la relación entre IDE y A β al encontrar que péptido A β marcado se unía a una proteína que ellos identificaron como IDE en fracciones citosólicas de cerebro e hígado de rata. Así mismo, se ha visto que además de la microglía las neuronas también pueden degradar péptido A β mediante la expresión de IDE en la superficie celular.⁶⁸ Con respecto a su distribución anatómica en el cerebro de individuos normales y con EA, Bernstein y colaboradores⁶⁹ usando ensayos inmunohistoquímicos encontraron que en los controles se localizaba en células piramidales de la neocorteza, el soma y las dendritas; por el contrario, en los pacientes se expresaba en las neuronas además de encontrarse asociada con las placas neuríticas.

- Demencia y diabetes

En los últimos años, se ha incrementado las evidencias que demuestran que existe una relación entre la resistencia a la insulina⁷⁰ con la EA. Existen varias evidencias que señalan que esta hormona regula los niveles extracelulares de A β ₄₀ y A β ₄₂ al favorecer el tráfico de la PPA β del aparato de Golgi a la membrana plasmática, donde lleva a cabo su procesamiento. Estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado que tanto la diabetes mellitus (DM) tipo 2 como la hiperinsulinemia incrementan el riesgo de desarrollar la EA. La DM tipo 2 se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre debido a la reducción en los niveles de insulina secretada además de que se presenta una resistencia a la insulina. La hiperinsulinemia conlleva a que haya niveles altos de insulina en sangre, lo cual favorecerá la acumulación del péptido A β al competir con ésta por su unión a la enzima (Figura 14).

Niveles altos de glucosa en sangre trae como consecuencia la activación de procesos inflamatorios que pueden favorecer la resistencia a la insulina.⁷¹ Se ha demostrado que mediadores de la inflamación como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina-1 beta (IL-1 β) o interleucina-6 (IL-6) reducen la sensibilidad a la insulina mediante la inhibición de los receptores de insulina (IR) además de que afectan la función de las mitocondrias favoreciendo la formación de especies reactivas de oxígeno.

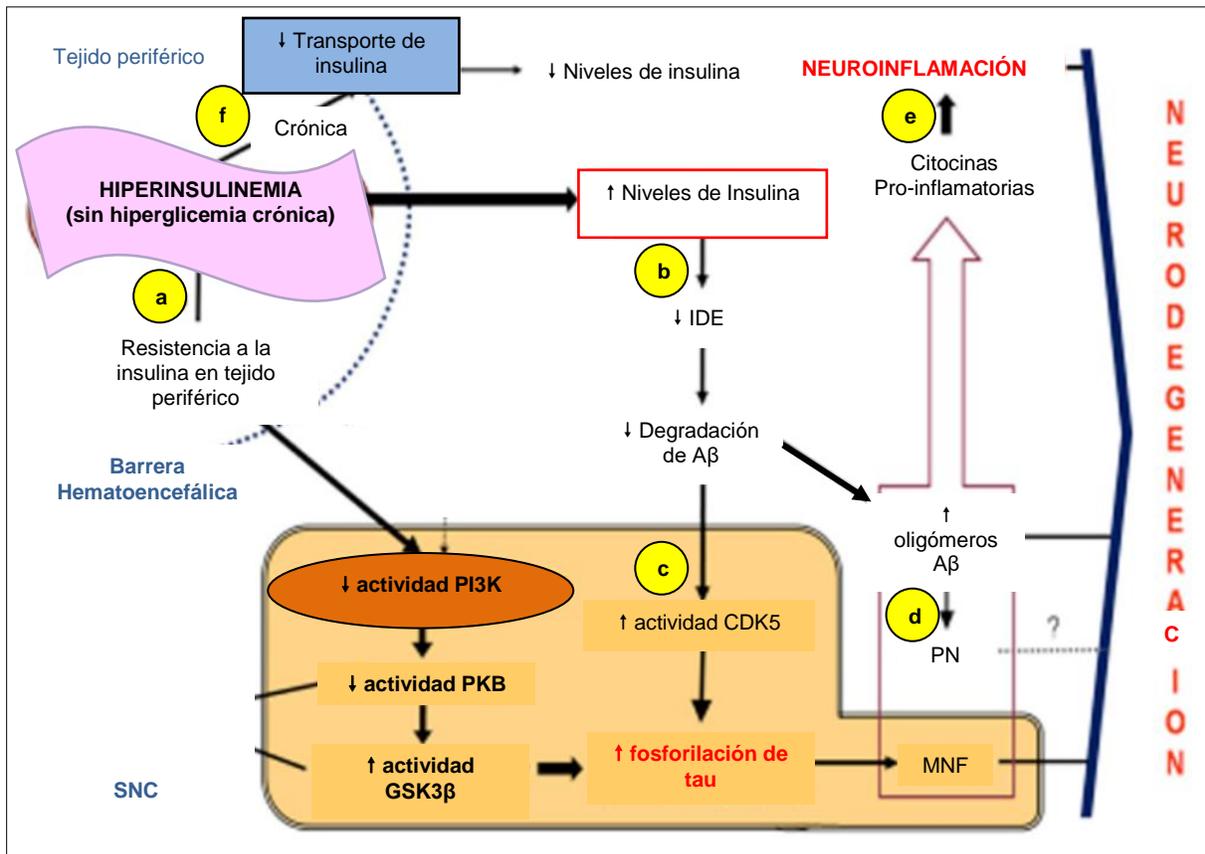


Figura 14. Relación de la resistencia a la insulina con la EA. (a) La resistencia a la insulina en el tejido periférico ocasiona que haya un exceso de insulina (hiperinsulinemia) (b) los niveles de esta hormona se verán aumentados en el SNC por lo que la actividad de IDE se verá disminuida con respecto a la degradación de otro de sus sustratos (A β) al haber competición entre A β y la insulina por unirse a la enzima (c) al haber un exceso de insulina la actividad de la ciclina dependiente de cinasa 5 (cdk5) se verá favorecida lo que trae como consecuencia la fosforilación de tau, así mismo la resistencia a la insulina ocasiona que la actividad de PI3K y PKB se vea disminuida con lo que la actividad de GSK3 β aumenta lo que contribuye a su vez con la fosforilación de tau que es el componente de las MNF (d,e) puesto que la degradación de A β disminuye incrementa la formación de oligómeros que son los responsables de la activación de la respuesta inmune innata en la glia al ser más tóxicos ocasionando un proceso inflamatorio (f) por lo tanto un evento de hiperinsulinemia sin hiperglicemia crónica disminuye los transportadores de insulina en la barrera hematoencefálica ocasionando que los niveles de insulina disminuyan. Fuente: modificado de Neumann, K.F., et al. 2008.⁷²

7.5 Colesterol y demencia

El cerebro es el órgano con mayor contenido de colesterol, teniendo aproximadamente el 20% del colesterol total. La síntesis de colesterol ocurre en el RE. Las células encargadas de su mantenimiento son las neuronas y las células de la glía, es decir, los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos. La síntesis de colesterol en el cerebro es diferente de la que ocurre en el resto del organismo debido a la existencia de la barrera hematoencefálica que regula el paso de las moléculas al cerebro. La unidad funcional en el cerebro son las neuronas, las cuales permiten la generación y transmisión de impulsos eléctricos a través del

axón.⁷³ El axón facilita la conducción al presentar mielina, la cual uno de sus componentes es el colesterol.

Un metabolismo anormal de lípidos conlleva al desarrollo de enfermedades tales como la EA, el síndrome Smith-Lemli Opitz, la enfermedad de Huntington ó la enfermedad de Niemann Pick tipo C. El transporte de colesterol depende de la fluidez de la membrana y de la existencia de micro dominios conocidos como balsas lipídicas (*rafts*). La cantidad de colesterol presente en la membrana puede modular la formación, agregación y eliminación del péptido A β al modificarse la estabilidad de los *rafts* puesto que es en la membrana donde la PPA β y algunas secretasas se encuentran (Figura 15).⁷⁴

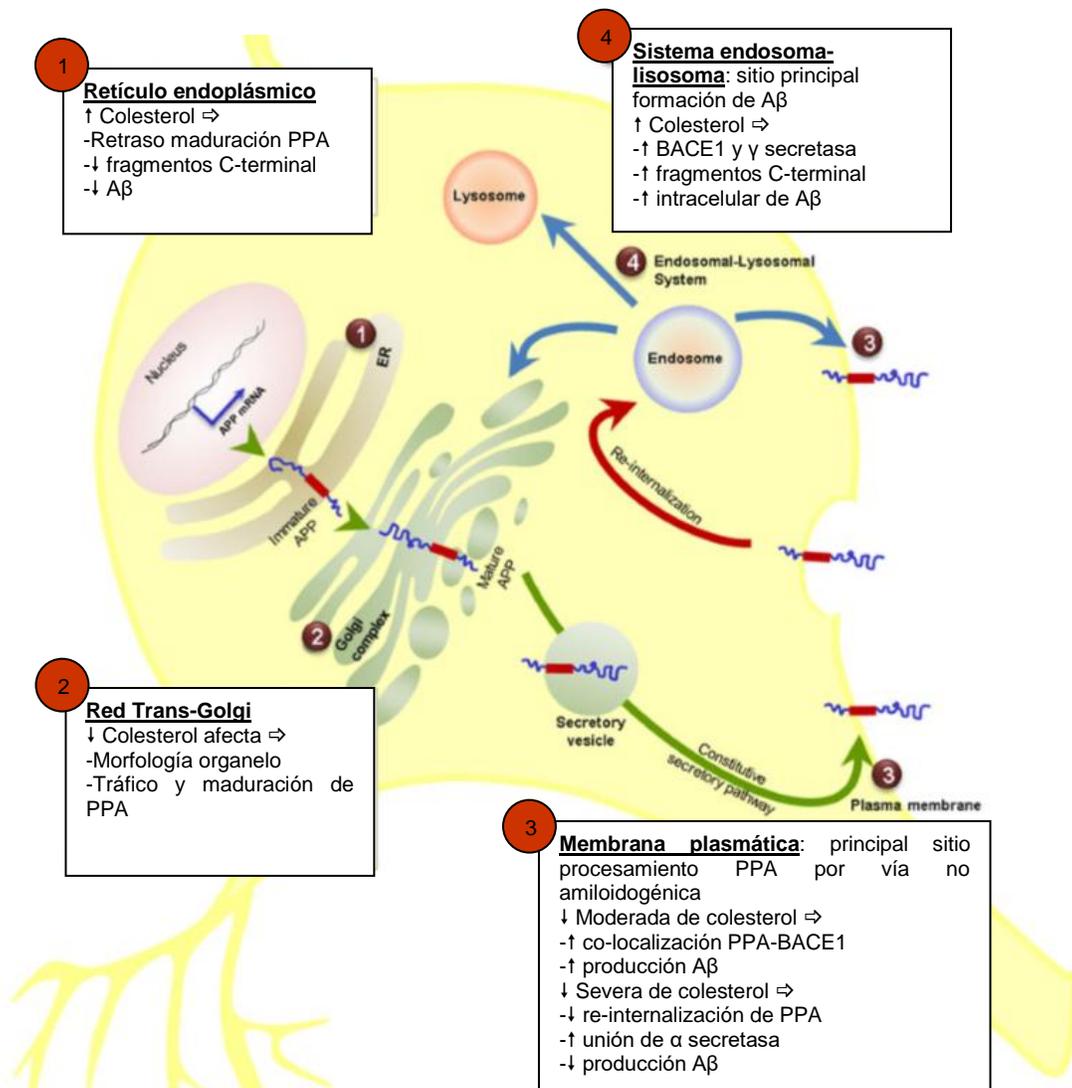


Figura 15. Influencia del colesterol en el procesamiento de la PPA β . La PPA β recién sintetizada es transportada a través del RE y la red trans-Golgi para su maduración (línea verde), posteriormente es transportada a la membrana donde puede ocurrir el procesamiento proteolítico por parte de α secretasa (línea roja) o por el contrario ser re-internalizada en vesículas endosomales donde será procesada por β o γ secretasa (línea azul). Fuente: modificado de Maulik, M., et al. 2013.⁷⁵

El procesamiento de la PPA β mediante la vía amiloidogénica tiene lugar al interior de los *rafts* mientras que la vía no amiloidogénica ocurre fuera de estos micro dominios donde participa α secretasa.⁷⁶

7.5.1 24-dehidrocolesterol reductasa (DHCR24)

Su gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 1, abarca 46.4 kb en los que se encuentra una región codificante compuesta por 1551 nucleótidos, ocho intrones y nueve exones.⁷⁷ El gen codifica para un polipéptido de 516 aminoácidos y 60.1 kDa que tiene tres dominios, un N-terminal anclado a la membrana, un flavín adenín dinucleótido (FAD) el cual es necesario para su actividad enzimática y un C-terminal localizado en el citoplasma.⁷⁸ Se expresa en tejidos que sintetizan colesterol tales como el cerebro, hígado y la glándula adrenal. A nivel celular se localiza en el RE y en el aparato de Golgi.

El principal sustrato de esta enzima es el desmosterol. Su actividad enzimática la ejerce al reducir la doble ligadura en el C₂₄ del desmosterol para dar lugar al colesterol (Figura 16). Esta conversión es dependiente de NADPH como agente reductor. En la síntesis de colesterol esta enzima puede participar por dos vías, la vía de Kandustch-Russell o la vía de Bloch. En la vía de Kandustch-Russell actúa al inicio de la reacción sobre el lanosterol mientras que en la vía de Bloch actúa al final de la reacción sobre el desmosterol.⁷⁷

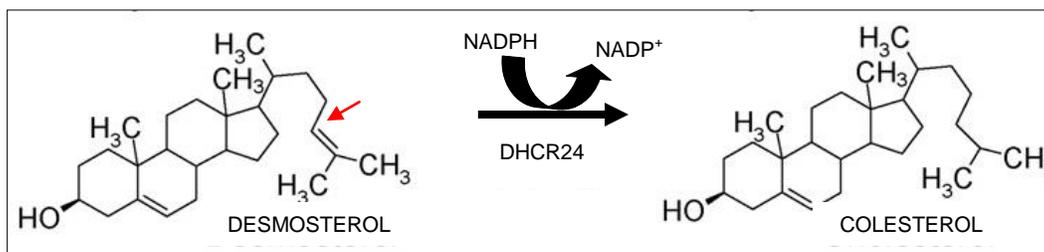


Figura 16. Reacción que cataliza la enzima DHCR24. Fuente: modificado de Pedretti, A., et al. 2008.⁷⁸

Un estudio⁷⁹ con ratones knockout para el gen DHCR24 demostró que aquellos que eran homocigotos (-/-) no tenían colesterol en la membrana mientras que en los heterocigotos (+/-) la actividad de β secretasa se veía aumentada por lo que los niveles del péptido A β incrementaban. Una deficiencia en esta enzima involucra un aumento en los niveles de desmosterol. Así mismo, otro estudio⁸⁰ vio que la sobreexpresión de DHCR24 en células en cultivo disminuye la toxicidad del péptido amiloide beta además de que confiere protección contra la apoptosis mediada por el estrés oxidativo y por el A β .

7.5.2 Protocadherina 11 (PCDH11)

Las cadherinas⁸¹ son glicoproteínas transmembranales que actúan como moléculas de adhesión calcio dependiente además de que participan en la señalización celular durante el desarrollo del sistema nervioso central. Cuentan con múltiples dominios cadherina extracelulares (EC) repetidos que al unirse a tres iones de Ca^{2+} promueven la adhesión celular. Esta familia se divide a su vez en tres subfamilias que son las cadherinas, cadherinas desmosomales y las protocadherinas.

Las protocadherinas se localizan principalmente en el sistema nervioso y corresponde al grupo más grande. En los vertebrados se clasifican de acuerdo a su organización genética (Figura 17). El primer subgrupo corresponde a las protocadherinas en clúster, el cual comprende tres grupos de genes: *Pcdh α* , *Pcdh β* y *Pcdh γ* en el brazo largo del cromosoma 5; el segundo subgrupo se clasifica de acuerdo a la presencia o ausencia de dominios de aminoácidos conservados y sólo comprende a la familia delta (δ). A su vez, la familia delta de protocadherinas se divide de acuerdo a la presencia o ausencia de un tercer motivo conservado en δ_1 y δ_2 . El primer subgrupo comprende a las protocadherinas 1, 7, 9 y 11 que se diferencian por tener siete EC; en cambio, el segundo subgrupo está formado por las protocadherinas 10, 17, 18 y 19, las cuales cuentan con seis EC.

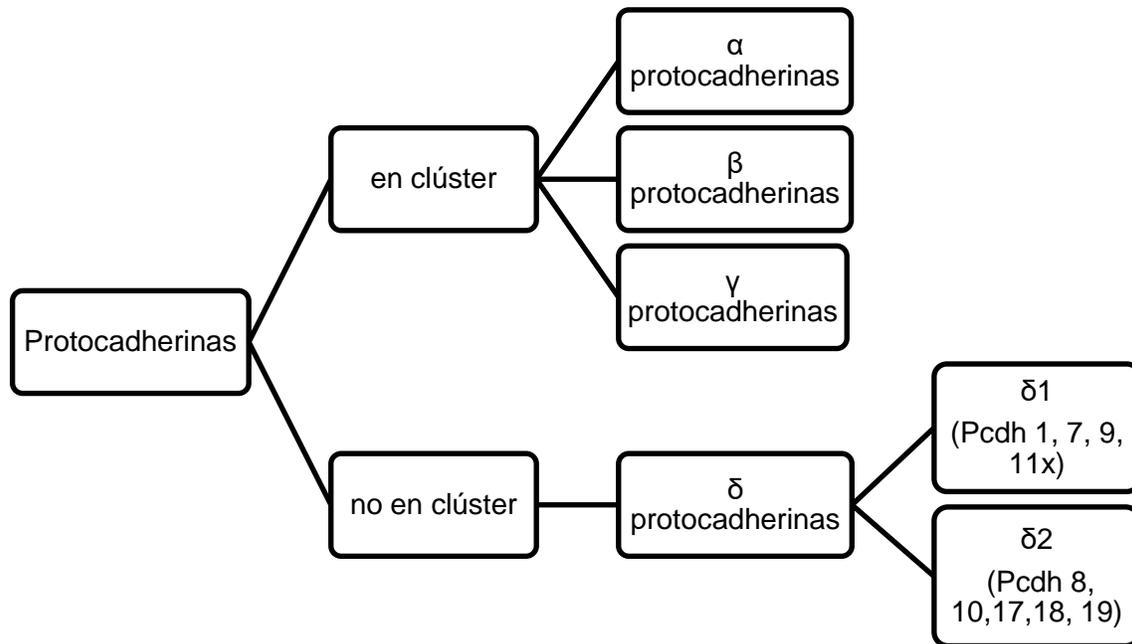


Figura 17. Clasificación de las protocadherinas. Fuente: modificado de Redies, C., K. Vanhalst, F. van Roy. 2005.⁸²

El gen de la protocadherina 11 se localiza en el cromosoma X. Un estudio⁸³ de asociación genética identificó un polimorfismo de un solo nucleótido en el cromosoma X que se encontraba dentro del gen PCDH11 el cual se asoció con la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Observaron que las mujeres que eran homocigotas presentaban un mayor riesgo en comparación con las mujeres heterocigotas y aquellas no portadoras.

7.6 Estudios de asociación

El desarrollo de las enfermedades complejas se ve influenciado por interacciones entre factores ambientales y alelos de varios genes. La identificación de aquellos alelos que puedan incrementar el riesgo de desarrollar cierta enfermedad permitirá entender su etiología.⁸⁴ En este sentido, los estudios de asociación permiten identificar una región en el genoma que pueda estar relacionada con una enfermedad dentro de una población mediante el uso de marcadores genéticos, principalmente los polimorfismos de un solo nucleótido. El objetivo de este tipo de estudios es identificar patrones en los polimorfismos que varían entre individuos con diferente estado de salud que puedan ser considerados como alelos de riesgo o protección.⁸⁵

En términos generales, considera cuatro etapas:

1ª Etapa: la selección de los grupos de estudio tomando en consideración que el tamaño de la muestra sea el adecuado para que sea comparable.

2ª Etapa: consiste en la extracción del material genético y genotipificación de las muestras mediante alguna técnica que permita identificar su genotipo.

3ª Etapa: es el análisis estadístico de los datos obtenidos para identificar aquellos polimorfismos que pudiesen involucrar susceptibilidad en el desarrollo de la enfermedad.

4ª Etapa: finalmente se evalúa que los resultados obtenidos sean replicados en poblaciones independientes de manera que se tenga credibilidad de que el resultado obtenido es válido.^{86,87}

Para la selección de los sujetos del grupo control se sugiere que su número sea mayor que el de los casos cuando la enfermedad tenga una prevalencia menor al 10 por ciento manteniendo una relación de cuatro controles por cada caso; por el contrario cuando se trata de un evento crónico pero no raro es mejor mantener la relación caso-control uno a uno.⁸⁸

Hay principalmente dos tipos de estudios de asociación genética, los estudios del genoma completo (GWAS) y los estudios en genes candidato. En los GWAS se escanea el genoma completo en la búsqueda de polimorfismos cuya frecuencia entre casos y controles difiera mientras que, en los estudios de genes candidato sólo se genotifican polimorfismos en ciertos genes que se sugiere pudiesen estar asociados con la enfermedad. Existen tres tipos de diseño en los estudios de asociación que son, los estudios de casos y controles, los estudios de cohorte y el diseño por tríos.^{86,89} Sin embargo, el diseño de estudio más utilizado es el que considera casos y controles. Son estudios retrospectivos en los cuales, se plantea la búsqueda de aquellos sujetos que estuvieron expuestos a la enfermedad o a los factores de riesgo que predispusieron a su desarrollo. De esta manera, las frecuencias alélicas de los pacientes con la enfermedad de interés son comparados con aquellos del grupo control, los cuales no presentan la enfermedad.⁹⁰ Entre las consideraciones que se deben tomar en cuenta para este tipo de diseño experimental es, que los sujetos de ambos grupos deben pertenecer a la misma población y que en ambos grupos se haya seguido el mismo procedimiento para la toma de muestra. Las ventajas que presenta son la obtención de resultados en un tiempo corto, el tamaño de la muestra es variable pudiendo ser tan vasto como uno lo desee, además de que es el estudio predilecto que se considera para el estudio

de enfermedades complejas. Sin embargo, presenta limitantes como la dificultad de identificar desviaciones o sesgos debidos a la subestructuración de la población ó la ocurrencia de falsos positivos durante la interpretación de los datos obtenidos del análisis estadístico.

En un estudio de asociación genética se determina la frecuencia de los alelos, la frecuencia de los genotipos y combinaciones multiloci para encontrar si los datos difieren entre casos y controles, cuando una variante es más frecuente en el grupo de casos se plantea que esté asociada con la enfermedad mientras que si es más frecuente en el grupo control, implicará un menor riesgo de desarrollarla.

7.6.1 Análisis de ancestría

En los estudios de asociación es necesario tomar en cuenta la ancestría de la población para asegurar que los resultados obtenidos son válidos. Al estimar las proporciones de ancestría de un individuo, se conoce de qué poblaciones proviene su genoma; cuando las proporciones no se distribuyen homogéneamente entre los grupos de estudio, puede dar lugar a asociaciones falsas puesto que uno de los grupos poblacionales pudiera estar más representado que los otros. Se ha visto por ejemplo, que la frecuencia alélica en varios genes varía entre poblaciones y se encuentra directamente relacionada con la distancia genética entre las mismas.⁹¹ Al respecto, la población mestizo-Mexicana es una mezcla de tres grupos raciales que son Amerindio, Europeo y en menor proporción por el Africano.^{92,93}

Para conocer el grado de mezcla y los diferentes componentes entre poblaciones e individuos se utilizan los marcadores informativos de ancestría (AIMs). Los AIMs son un conjunto de polimorfismos de una secuencia particular de DNA que muestran diferencias en su frecuencia entre poblaciones de diferente región geográfica en el mundo.

VIII. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia que se presenta con mayor prevalencia en el adulto mayor. Es un problema de salud pública que afecta tanto al que la padece como a su entorno familiar debido a la discapacidad que conlleva, además de que no es parte normal del envejecimiento. Es por ello necesario, implementar estudios que permitan identificar variantes en el genoma que puedan ser utilizados como marcadores de la enfermedad, los cuales en un futuro puedan ser empleados como auxiliares en su diagnóstico y tratamiento.

En este sentido, los estudios de asociación entre casos y controles buscan establecer una relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado. Además de que han permitido identificar aquellos polimorfismos cuya presencia pudiese conferir un incremento en el riesgo de desarrollar una enfermedad. Sin embargo, es necesario evaluarlos en distintas poblaciones puesto que cada una está conformada por una mezcla genética diferente.

En la búsqueda de aquellas variantes polimórficas que pudiesen estar relacionadas con la enfermedad de Alzheimer, en el laboratorio se ha venido construyendo una base de datos con los polimorfismos en los genes que de acuerdo con reportes en la literatura, su presencia confiere susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Estos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son evaluados mediante PCR en tiempo real, de manera que del análisis estadístico de las frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas se determine aquel polimorfismo o polimorfismos que pudieran estar relacionados con un incremento en el riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en la población Mexicana. Estudios realizados en el laboratorio, han encontrado que el polimorfismo rs20417 en el gen de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) parece incrementar la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad en nuestra población.⁹⁴

Con la finalidad de identificar otros posibles genes candidatos como marcadores genéticos, se realizó la genotipificación de polimorfismos en genes involucrados con la eliminación del péptido amiloide beta. Estudios reportados en la literatura, realizados en otras poblaciones, han encontrado que SNP en los genes de IDE, ACE, DHCR24 y PCDH11 parecen estar relacionados con la enfermedad de Alzheimer; por lo que, el análisis de los resultados obtenidos mostrará qué polimorfismos están presentes en la población Mexicana y si pudiesen estar asociados con la enfermedad de Alzheimer.

IX. HIPÓTESIS

La presencia de combinaciones alélicas en los genes ACE, IDE, DHCR24 y PCDH11 conferirá susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en la población Mexicana.

X. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar los polimorfismos de un solo nucleótido en los genes de la enzima convertidora de angiotensina, enzima degradadora de insulina, 24-dehidrocolesterol reductasa y protocadherina 11 como posibles marcadores genéticos para la enfermedad de Alzheimer en población Mexicana.

Objetivos particulares

- Realizar PCR en tiempo real para la genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido en los genes mencionados.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en los genes mencionados en pacientes mexicanos con EA y controles.
- Determinar el equilibrio de Hardy-Wienberg para conocer las frecuencias que deben observarse en la población para cada genotipo y la variabilidad genética que se presenta en ambos grupos de estudio.
- Estimar la distribución de las proporciones de ancestría de cada una de las poblaciones ancestrales en los grupos de estudio.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en los genes mencionados entre pacientes con EA y controles, controlando para sexo, edad y ancestría, y determinar si existen diferencias significativas entre los grupos de estudio.
- Identificar un perfil de riesgo para el desarrollo de estas patologías que permita el desarrollo de nuevas estrategias de atención.
- Conocer los patrones de ligamiento entre loci para la búsqueda de un desequilibrio de ligamiento que pudiese estar asociado con la enfermedad de Alzheimer.

XI. METODOLOGÍA

11.1 Grupos de estudio

El estudio consideró dos grupos, casos y controles. Se analizaron 94 muestras para el grupo de pacientes con diagnóstico de demencia tipo Alzheimer y 100 muestras para el grupo control. Los criterios de inclusión y exclusión que se tomaron en cuenta fueron los siguientes:

11.1.1 Criterios de inclusión pacientes

- Individuos mayores de 60 años de edad que sepan leer y escribir, con nacionalidad mexicana en al menos tres generaciones.
- Femeninos y masculinos
- Clínicamente diagnosticados con probable EA.
- Clínicamente diagnosticados con probable DV.
- Que acepten su participación mediante acta circunstanciada firmada por los menos por dos parientes en línea directa.

11.1.2 Criterios de exclusión pacientes

- Pacientes que presenten otro tipo de enfermedad neurodegenerativa o neuroinfecciosa agregada.
- Pacientes con neoplasia.
- Que no acepten participar en el estudio.

11.1.3 Criterios de inclusión controles

- Individuos mayores de 60 años de edad que sepan leer y escribir, con nacionalidad mexicana en al menos tres generaciones.
- Femeninos y masculinos.
- Evaluados clínicamente con las mismas pruebas que los pacientes y que no muestren datos clínicos de demencia.
- Que acepten su participación mediante acta circunstanciada firmada.

11.1.4 Criterios de exclusión controles

- Individuos que presenten otro tipo de enfermedad neurodegenerativa o neuroinfecciosa agregada.
- Que no acepten participar en el estudio.

En la siguiente tabla se muestran agrupados datos de edad promedio y género de acuerdo al grupo de estudio.

Tabla 2. Edad y género de los grupos de estudio

Grupo	Edad	Género	
		F	M
Casos	76±9.9	65	29
Controles	72±12.3	64	36

11.2 Obtención de muestra, extracción y cuantificación de DNA

Se obtuvo una muestra de sangre periférica en tubos de 5 mL con anticoagulante mediante venopunción de cada uno de los sujetos. A continuación, se empleó el kit QIAmp[®] DNA Blood Midi Kit de Quiagen para la extracción de DNA cuya metodología se describe en el Anexo 1. Posteriormente, se cuantificó el DNA mediante el espectrofotómetro ASP-3700[®] de ACTGene para conocer la concentración de cada una de las muestras y poder realizar diluciones para obtener alícuotas de 10 ng/ μ L que se guardaron en congelación hasta su uso.

11.3 Técnica de estudio

La técnica de discriminación alélica fue utilizada para la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System de la marca Applied Biosystems[®]. Se utilizaron placas de 96 pozos, realizando por duplicado cada muestra y poniendo un control negativo, una mezcla de reacción sin DNA, por cada una de las sondas empleadas.

Tabla 3. Mezcla de reacción

Agua	1.85 μ L
Master Mix	3.0 μ L
Sonda TaqMan (40x)	0.15 μ L
DNA (10 ng/ μ L)	2.0 μ L
45 ciclos de amplificación	

La reacción de PCR consta de tres etapas:

1. Desnaturalización. La temperatura alcanza los 95°C de manera que la doble cadena de DNA se separa dando lugar a dos cadenas sencillas.
2. Alineamiento. La temperatura desciende aproximadamente hasta los 50°C de manera que los primers puedan localizarse en el extremo 3' de las cadenas sencillas.
3. Elongación. La temperatura se incrementa hasta los 72°C permitiendo la actividad de la polimerasa, la cual incorpora a partir de donde termina la secuencia del primer desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs donde N puede ser adenina, timina, citocina o guanina) a la cadena molde.

La PCR en tiempo real permite monitorear en cada ciclo la aparición de DNA producto de la reacción mediante el uso de fluoróforos, tras lo cual el resultado se visualiza en una gráfica de amplificación que consiste en la fluorescencia leída por el termociclador (eje y) en función del número de ciclos (eje x). En la curva de amplificación se pueden identificar tres fases, la primera o inicial donde la fluorescencia se encuentra fuera de los límites de detección del equipo; la segunda o exponencial donde se da un incremento en la fluorescencia y la tercera donde la reacción finaliza (Figura 18).

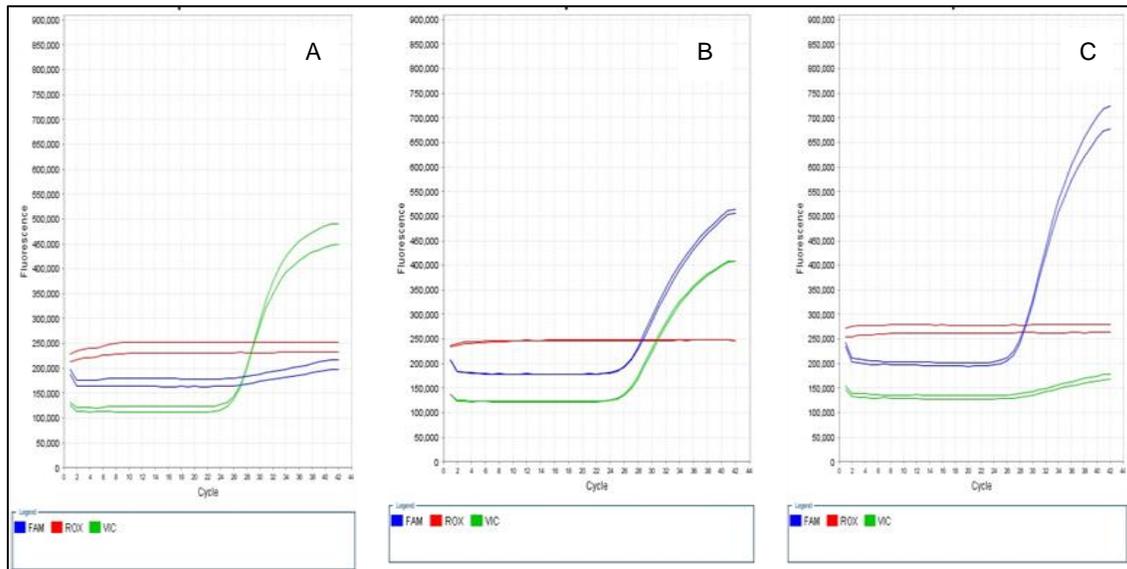


Figura 18. Curva de amplificación. Ejemplo de las posibles señales de amplificación, en donde en la parte inferior se muestran los fluoróforos utilizados FAM, ROX (fluoróforo basal) y VIC. (A). Amplificación del alelo marcado con el fluoróforo VIC por encima del marcador basal indica que el genotipo del individuo es homocigoto para el alelo 1. (B). Amplificación de ambos alelos lo que indica que la muestra es heterocigota. (C). Amplificación del alelo marcado con el fluoróforo FAM lo que indica que el genotipo es homocigoto para el alelo 2.

Las sondas TaqMan[®] son oligonucleótidos marcados con dos tipos de fluoróforos: un donador en el extremo 5', regularmente VIC o FAM, que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Durante la amplificación, la polimerasa hidroliza el extremo 5' de la sonda permitiendo que se libere la señal fluorescente del donador la cual es captada por el detector (Figura 19).

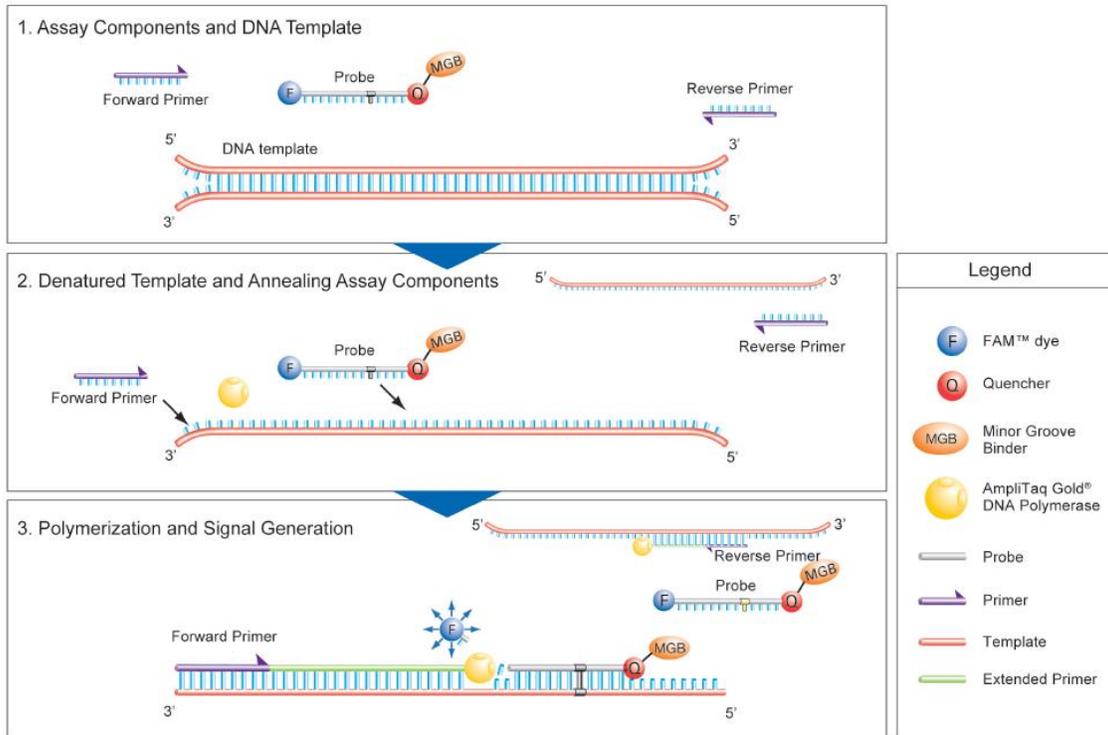


Figura 19. PCR en tiempo real usando sondas TaqMan®. Fuente: TaqMan® Gene Expression Assay solutions

Una de las aplicaciones de la PCR en tiempo real es la genotipificación de SNP. Los experimentos de genotipificación determinan si una muestra es homocigota (sólo tiene al alelo 1 ó al alelo 2) ó heterocigota (tiene ambos alelos); para esto, es necesario contar con dos sondas con un fluoróforo diferente específico para cada alelo de manera que un aumento significativo en la señal fluorescente generada durante el proceso de amplificación indicará el alelo presente en la muestra. El equipo interpreta la intensidad en la fluorescencia emitida por cada alelo en un diagrama de dispersión (Figura 20) donde se observa el genotipo de cada una de las muestras.

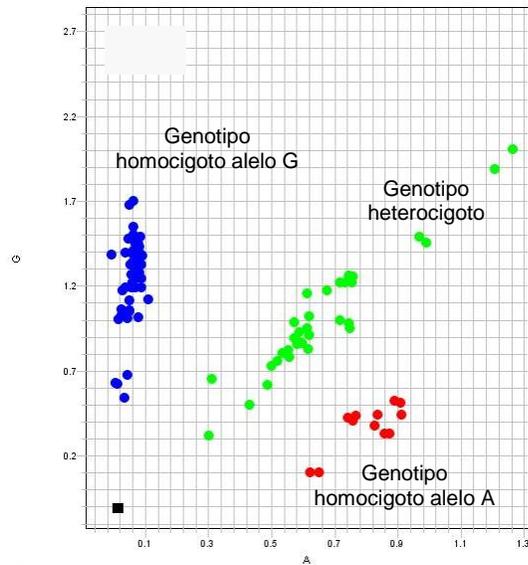


Figura 20. Diagrama de dispersión. Gráfica mediante la cual se observa el genotipo de cada una de las muestras mediante la técnica de discriminación alélica, del lado izquierdo (color azul) se encuentran las muestras cuyo genotipo resultó homocigoto para el alelo G, en la parte central (color verde) el genotipo heterocigoto mientras que del lado derecho (color rojo) las muestras cuyo genotipo fue homocigoto para el alelo A. Fuente: imagen obtenida de uno de los experimentos

11.4 Polimorfismos analizados

Un polimorfismo es el resultado de una mutación. Los polimorfismos son referidos de acuerdo a la mutación que les dio origen, en este estudio se trabajó con los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) al ser los más simples y utilizados en los estudios de asociación genética. Un SNP es una variación en la secuencia de DNA debida al cambio de una sola base (A, G, C o T), para que sea considerado como tal debe ocurrir en al menos 1% de la población.⁹⁵ Al presentarse con gran frecuencia en cualquier parte del genoma permite que sean utilizados como marcadores genéticos para el estudio de genes que pudiesen estar asociados con cierto rasgo o enfermedad.

Para el estudio de asociación genética se eligieron 14 polimorfismos de la base de datos Alzforum en los que previamente se han llevado a cabo estudios en otras poblaciones con la finalidad de ver su expresión en ambos grupos de estudio en la población Mexicana. De éstos, 3 se localizan en el gen de la enzima convertidora de angiotensina, 4 en el gen de la enzima degradadora de insulina, 3 en el gen de la 24-dehidrocolesterol reductasa y 4 en el gen de la protocadherina 11 (Tabla 4).

Tabla 4. Polimorfismos seleccionados para el estudio de asociación

Gen	Cromosoma	Polimorfismo	Alelo 1	Alelo 2	Región
ACE	17	rs4291	A	T	5' exón 1
		rs4343	A	G	Exón 16
		rs4362	C	T	Exón 23
IDE	10	rs3758505	C	A	5' exón 1
		rs4646953	A	G	5' exón 1
		rs4646954	A	G	Exón 1
		rs3781239	C	G	Intrón 10
DHCR24	1	rs7374	G	A	Exón 9
		rs638944	G	A	Intrónica
		rs718265	A	G	Exón 7
PCDH11	X	rs5984894	A	G	Intrónica
		rs2573905	C	T	Intrónica
		rs5941047	C	T	Intrónica
		rs4568761	C	T	Intrónica

Fuente: www.alforum.org y www.ncbi.nlm.nih.gov

11.5 Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis de los datos obtenidos de la gráfica de dispersión y la curva de amplificación para determinar la frecuencia alélica, frecuencia genotípica, haplotipos, desequilibrio de ligamiento y el equilibrio de Hardy-Wienberg de cada uno de los genes. Además, se realizó una corrección de los datos obtenidos con base a la ancestría.

Para el caso del gen PCDH11, solo se tomo en cuenta las frecuencias alélicas y genotípicas de los sujetos del género femenino. Debido que la localización de este gen es en el cromosoma sexual X, puede dar lugar a genotipos homocigotos o heterocigotos por la información que reciben de ambos progenitores. Por el contrario, en los individuos del género masculino al contar con una sola copia del cromosoma X generará que en una muestra se

cuenta con un exceso de genotipos homocigotos para uno u otro de los alelos lo que conduciría a que la muestra no siga el equilibrio de Hardy-Wienberg.

Primero, se evaluó si los datos correspondientes al grupo control cumplían con el principio de Hardy-Wienberg utilizando el programa GenAIEx 6.5.⁹⁶ Este programa emplea la prueba de Chi cuadrada (χ^2) para comparar entre el genotipo observado y el esperado. Cuando la probabilidad de obtener el valor de χ^2 observado es mayor a 0.05 ($0.05 < p < 1.0$) el resultado no es estadísticamente significativo por lo que se aceptará la hipótesis nula (H_0) que considera que la recombinación en una población es al azar, por el contrario si el valor es menor a 0.05 ($0 < p < 0.05$) el resultado es estadísticamente significativo por lo que se rechaza H_0 concluyendo que la recombinación en una población no es al azar. El equilibrio de Hardy-Wienberg considera la unión aleatoria de los alelos para formar genotipos, por lo que permite el cálculo de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas. Para el cálculo se toman en cuenta las siguientes hipótesis: 1) los individuos de una población tienen la misma probabilidad de aparearse y ésta es al azar, 2) la población es suficientemente grande, 3) la población no está sometida a la migración, mutación o selección por lo que no habrá pérdida ni ganancia de alelos, 4) las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen de generación en generación; de cumplirse estas hipótesis las poblaciones genéticas se mantienen en equilibrio.

Se utilizó el programa SNPStats⁹⁷ para realizar la estadística descriptiva y el análisis de cada uno de los polimorfismos para obtener su frecuencia alélica y genotípica. Una frecuencia es una proporción o porcentaje expresado normalmente como fracción decimal. La frecuencia alélica hace referencia a la proporción de un alelo, que es la forma alternativa de un gen, en un locus en determinada población mientras que la frecuencia genotípica es la posible combinación de alelos que puede dar lugar a tres posibilidades: homocigoto para uno de los alelos, heterocigoto u homocigoto para el otro alelo. Las frecuencias genotípicas se analizaron mediante su ajuste a diferentes modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo, sobre-dominante) lo que permitió conocer el valor de p y la razón de momios (OR), siendo un primer filtro para conocer aquellos polimorfismo que presentasen diferencias significativas.

Posteriormente, mediante el programa Arlequin⁹⁸ 3.11 se determinó las posibles combinaciones de alelos para todos los polimorfismos estudiados así como individualmente por gen. Una vez conocidos, fue necesario conocer si su presencia pudiese o no estar involucrada en el desarrollo de la enfermedad por lo que se introdujo los valores de frecuencia del grupo de pacientes con EA y del grupo control en la tabla de contingencia 2x2 del programa EpiInfo6 obteniéndose así el valor de OR, este valor indica el riesgo relativo de que se presente un evento, en este caso la EA.

Tras el análisis estadístico por Chi cuadrada (χ^2) en las frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas y haplotipos se consideró un valor de $p < 0.05$ y $OR > 1.0$. Cuando del análisis estadístico se obtiene una $OR > 1$, significa que el factor en estudio se está comportando como un factor de riesgo mientras que una cifra menor a uno ($OR < 1$) implica que el factor en estudio se comporta como un factor protector. También, puede ocurrir que se obtenga un resultado igual a uno ($OR = 1$) en cuyo caso la interpretación será que no existe asociación entre el factor de interés y la enfermedad o evento.

Para conocer si existía un desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos de cada gen se ocupó el programa Haploview.⁹⁹ Del análisis comparativo entre loci se obtuvo un esquema que mostraba la forma en la cual los polimorfismos pudiesen heredarse, ya fuese en forma de bloque o de forma aleatoria. Un desequilibrio de ligamiento implica que los alelos de genes diferentes no se asocian al azar en los gametos. Los parámetros más empleados son D' y el coeficiente de correlación r^2 .¹⁰⁰ D' indica la recombinación entre alelos teniendo una escala de 0 a 1, un valor de $D' = 0$ señala que existe un equilibrio de ligamiento debido a que la recombinación es al azar mientras que un valor de $D' = 1$ indica que hay un desequilibrio de ligamiento y por lo tanto no existe una recombinación entre alelos dentro de una población debido a que ambos loci son dependientes entre sí por lo que siempre se heredarán en conjunto.

Para asegurar que las asociaciones encontradas no fueran debidas a variaciones en la ancestría se seleccionaron un grupo de 10 AIMs, los cuales se enlistan en la Tabla 5. Puesto que diversas enfermedades tienen distinta prevalencia entre grupo poblacionales¹⁰¹, es importante realizar esta evaluación considerando la proporción presente de estas ancestrías en los sujetos de ambos grupos de estudio con la finalidad de evaluar si los resultados que

cumplieron con los parámetros de p y OR establecidos no fueron resultado de asociaciones falso-positivas debidas al flujo genético de la población; para ello se estimó la proporción ancestral del grupo racial Amerindio de cada una de las muestras mediante el programa Structure¹⁰² y se realizó la corrección por ancestría mediante el programa SNPStats⁹⁷ considerando como variables género, edad y ancestría. Como se muestra en el Anexo 4, la distribución de estas tres ancestrías entre los grupos de estudios es semejante, lo que nos indica que están representadas homogéneamente.

Tabla 5. AIMS utilizados en el estudio

Gen	Polimorfismo	Alelo 1	Alelo 2
CKM	rs4884	G	A
	rs2695	T	C
ROBO2	rs17203	G	C
	rs2862	G	A
SAP30L	rs3340	T	C
	rs722098	A	G
CA10	rs203096	G	T
	rs223830	G	A
DRD2	rs1800498	G	A
DARC	rs2814778	A	G

XII. RESULTADOS

12.1 Equilibrio de Hardy-Wienberg

Este principio determina qué frecuencias genotípicas deberíamos observar al asumir que los alelos se transmiten de forma independiente entre generaciones. Si no hay diferencias significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas se dice que la población se encuentra en equilibrio. En los estudios de asociación genética entre casos y controles, el equilibrio Hardy-Wienberg debe ser evaluado solamente en el grupo control al ser una representación de la población general y donde este principio debería de cumplirse.

De manera contraria en los pacientes (en nuestro caso sujetos con demencia), es posible que algunas de las frecuencias genotípicas observadas sean diferentes de las esperadas ya que permitirá identificar aquellos polimorfismos que pudiesen estar involucrados en el desarrollo y aparición de la enfermedad. Por otro lado, la evaluación del EHW permite también detectar errores de genotipificación debido a que en ocasiones durante la interpretación de resultados ocurre que es más fácil detectar un genotipo que otro; para ello se utiliza la prueba de Chi cuadrada (χ^2) utilizando las frecuencias genotípicas observadas, obtenidas de los datos, y las frecuencias genotípicas que se esperan en el equilibrio.

Al probar si los polimorfismos estudiados y su frecuencia genotípica cumplían con el EHW se encontró que el polimorfismo rs4362 del gen de ACE no seguía el EHW en el grupo control. En la Tabla 6 se presentan los resultados en el grupo de pacientes con demencia tipo Alzheimer y en la Tabla 7 los del grupo control mediante el uso del programa GenAEx 6.5.

Tabla 6. Equilibrio de Hardy-Wienberg en el grupo de pacientes con EA

Grupo	Gen	Polimorfismo	p
Casos	ACE	rs4291	0.902
		rs4343	0.299
		rs4362	0.385
	IDE	rs3758505	0.147
		rs4646953	0.945
		rs4646954	0.531
		rs3781239	0.471
	DHCR24	rs7374	0.002
		rs638944	0.383
		rs718265	0.533
	PCDH11	rs5984894	7.10E-08
		rs2578905	0.141
		rs5941047	0.116
		rs4568761	0.059

Tabla 7. Equilibrio de Hardy-Wienberg en el grupo control

Grupo	Gen	Polimorfismo	p
Controles	ACE	rs4291	0.574
		rs4343	0.097
		rs4362	1.77E-04
	IDE	rs3758505	0.258
		rs4646953	0.294
		rs4646954	0.738
		rs3781239	0.751
	DHCR24	rs7374	0.180
		rs638944	0.845
	PCDH11	rs718265	0.428
		rs5984894	0.387
		rs2578905	0.726
		rs5941047	0.080
		rs4568761	0.366

12.2 Frecuencias alélicas

La distribución de los alelos en cada uno de los polimorfismos de los genes en estudio permitió calcular su frecuencia alélica mediante el programa SNPStats, los resultados de su frecuencia se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Frecuencia de los alelos para los polimorfismos estudiados

Gen	Polimorfismo	Alelo	Frecuencia	
			Alzheimer	Control
ACE	rs4291	A	0.71	0.63
		T	0.29	0.37
	rs4343	A	0.63	0.56
		G	0.37	0.44
	rs4362	C	0.63	0.46
		T	0.37	0.55
IDE	rs3758505	C	0.42	0.22
		A	0.58	0.78
	rs4646953	A	0.85	0.90
		G	0.15	0.10
	rs4646954	A	0.29	0.41
		G	0.71	0.59
	rs3781239	C	0.93	0.88
		G	0.07	0.12
DHCR24	rs7374	G	0.24	0.17
		A	0.76	0.83
	rs638944	G	0.64	0.66
		A	0.36	0.34
	rs718265	A	0.49	0.42
		G	0.51	0.57
PCDH11	rs5984894	A	0.75	0.79
		G	0.25	0.21
	rs2573905	C	0.18	0.20
		T	0.82	0.80
	rs5941047	C	0.76	0.77
		T	0.24	0.23
	rs4568761	C	0.83	0.82
		T	0.17	0.18

Para determinar el alelo cuya presencia pudiese significar susceptibilidad en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, se realizó la comparación entre grupos de las frecuencias de los alelos en los polimorfismos que en el programa SNPStats resultaron con diferencia significativas. De acuerdo a la Tabla 9, la presencia del alelo C del polimorfismo rs3758505 en el gen de la enzima degradadora de insulina involucra un incremento de aproximadamente 3 veces en el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Tabla 9. Comparación entre frecuencias alélicas

Gen	Polimorfismo	Alelo	Frecuencia		p	OR	95% CI
			Alzheimer	Control			
IDE	rs3758505	C	0.42	0.22	0.002	2.57	1.33—5.02
		A	0.58	0.78			
	rs4646953	A	0.85	0.90	0.286	0.63	0.24—1.60
		G	0.15	0.10			
	rs4646954	A	0.29	0.41	0.076	0.59	0.31—1.10
		G	0.71	0.59			
DHCR24	rs7374	G	0.24	0.17	0.221	1.54	0.73—3.31
		A	0.76	0.83			

12.3 Frecuencias genotípicas

La distribución de los genotipos en los polimorfismos estudiados en los grupos de estudio, se muestra en la Tabla 10. Sin embargo, se realizó la comparación estadística de las frecuencias genotípicas entre los distintos grupos para determinar el genotipo cuya presencia pudiese significar un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad, los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 10. Frecuencia de los genotipos para los polimorfismos estudiados

Gen	Polimorfismo	Genotipo	Frecuencia	
			Alzheimer	Control
ACE	rs4291	A/A	0.51	0.41
		A/T	0.40	0.44
		T/T	0.09	0.15
	rs4343	A/A	0.43	0.36
		A/G	0.41	0.41
		G/G	0.16	0.23
	rs4362	C/C	0.41	0.30
		C/T	0.43	0.31
		T/T	0.16	0.39
IDE	rs3758505	C/C	0.12	0.02
		C/A	0.60	0.40
		A/A	0.28	0.57
	rs4646953	A/A	0.72	0.81
		A/G	0.26	0.19
		G/G	0.02	0.00
	rs4646954	A/A	0.10	0.16
		A/G	0.38	0.50
		G/G	0.52	0.34
rs3781239	C/C	0.86	0.78	
	C/G	0.14	0.21	
	G/G	0.00	0.01	
DHCR24	rs7374	G/G	0.00	0.01
		G/A	0.49	0.32
		A/A	0.51	0.67
	rs638944	G/G	0.39	0.44
		G/A	0.50	0.44
		A/A	0.11	0.12
	rs718265	A/A	0.22	0.20
		A/G	0.53	0.45
		G/G	0.24	0.35
PCDH11	rs5984894	A/A	0.69	0.64
		A/G	0.12	0.30
		G/G	0.18	0.06
	rs2573905	C/C	0.06	0.03
		C/T	0.25	0.33
		T/T	0.69	0.64
	rs5941047	C/C	0.62	0.55
		C/T	0.29	0.44
		T/T	0.09	0.02
rs4568761	C/C	0.72	0.66	
	C/T	0.22	0.33	
	T/T	0.06	0.02	

Tabla 11. Comparación entre frecuencias genotípicas

			Frecuencia				
Gen	Polimorfismo	Genotipo	Alzheimer	Control	p	OR	95% CI
IDE	rs3758505	C/C	0.09	0.00	0.010	0.00	0.00—NA
		C/A	0.61	0.42		0.39	0.15—0.99
		A/A	0.30	0.58		1.00	NA
	rs4646953	A/A	0.70	0.81	0.034	1.00	NA
		A/G	0.27	0.19		0.49	0.23—1.04
		G/G	0.03	0.00		0.00	0.00—NA
	rs4646954	A/A	0.09	0.16	0.016	3.31	1.18—9.27
		A/G	0.40	0.51		2.20	1.13—4.28
		G/G	0.52	0.33		1.00	NA
DHCR24	rs7374	G/G	0	0.01	0.059	NA	0.00—NA
		G/A	0.47	0.33		0.51	0.27—0.95
		A/A	0.53	0.66		1.00	NA

Valor de p y OR de acuerdo al modelo de herencia codominante

De acuerdo a la Tabla 11, el genotipo homocigoto para el alelo A confiere un incremento de aproximadamente 3 veces en el riesgo de desarrollar la enfermedad mientras que el genotipo heterocigoto A/G involucra un incremento de 2 veces, ambos genotipos corresponden al polimorfismo rs4646954 localizado en el gen de la enzima degradadora de insulina.

12.4 Combinaciones multiloci y Haplotipos

Se utilizó el programa Arlequin 3.11 en el que se obtuvieron 70 posibles combinaciones (Anexo 2). Sin embargo, al comparar las frecuencias en ambos grupos de estudio solo 6 resultaron significativas ($p < 0.05$) para el grupo de pacientes con demencia tipo Alzheimer. Como se muestra en la Tabla 12, la combinación AACAGCAGG resultó ser la más frecuente en este grupo de estudio presentándose en el 11% de la población.

Tabla 12. Combinaciones multiloci para el grupo de pacientes con demencia tipo Alzheimer

	% Frec	ACE		IDE				DHCR24			p
		rs4291	rs4343	rs3758505	rs4646953	rs4646954	rs3781239	rs7374	rs638944	rs718265	
AAAAACAGA	4	A	A	A	A	A	C	A	G	A	0.0439
AAAAGCAAG	10	A	A	A	A	G	C	A	A	G	0.0012
AACAGCAGA	4	A	A	C	A	G	C	A	G	A	0.0439
AACAGCAGG	11	A	A	C	A	G	C	A	G	G	0.0004
TGAAGCGGA	5	T	G	A	A	G	C	G	G	A	0.0239
TGCAGCAGA	9	T	G	C	A	G	C	A	G	A	0.0022

Posteriormente, se realizó el mismo análisis pero ahora considerando cada gen. Se encontró 4 haplotipos correspondientes al gen de la enzima convertidora de angiotensina, 8 para el gen de la enzima degradadora de insulina y 7 para el gen de la 24-dehidrocolesterol reductasa (Anexo 3). Como se muestra en la Tabla 13, el haplotipo CAGC se presentó en el 24% del grupo de casos mientras que los haplotipos AAAC y CGGC en ambos grupos de estudio; sin embargo, debido a que su frecuencia en el grupo de casos es mayor con respecto al grupo control su presencia pudiese incrementar el riesgo de desarrollar la enfermedad. Para el caso del haplotipo AAAC su presencia conferiría un incremento de 16 veces en el riesgo de desarrollar la enfermedad, mientras que para el haplotipo CGGC sería de 7 veces.

Tabla 13. Haplotipos para el gen IDE

	IDE							OR	p
	% Frec A	% Frec C	rs3758505	rs4646953	rs4646954	rs3781239			
CAGC	24	0	C	A	G	C	Indef	1.9E-07	
AAAC	14	1	A	A	A	C	16	0.0005	
CGGC	7	1	C	G	G	C	7	0.0308	

%Frec A= % frecuencia grupo casos, % Frec C= % frecuencia grupo control

12.5 Desequilibrio de Ligamiento

La Tabla 14 muestra los resultados que se obtuvieron de la comparación entre loci en la búsqueda de un desequilibrio de ligamiento utilizando el programa Haploview⁹⁹. Como se puede observar en la Tabla, no hay evidencia de la existencia de un desequilibrio de ligamiento en los genes de ACE e IDE. Si bien, el polimorfismo rs3781239 y rs4646953 del gen de IDE tiene un valor de $D'=1$ su coeficiente de correlación (r^2) es muy bajo siendo de 0.014, además su esquema de desequilibrio no mostró la presencia de algún bloque. Por el contrario, para el gen de DHCR24 se encontró la presencia de un desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs7374 y rs718265 como se muestra en la Figura 21.

Tabla 14. Valores de D' y r^2 para los genes ACE, IDE y DHCR24

Gen	Locus 1	Locus 2	D'	r^2
ACE	rs4291	rs4343	0.751	0.413
	rs3781239	rs4646954	0.366	0.007
IDE	rs3781239	rs4646953	1.0	0.014
	rs3781239	rs3758505	0.195	0.003
	rs4646954	rs4646953	0.713	0.038
	rs4646954	rs3758505	0.424	0.092
	rs4646953	rs3758505	0.006	0.0
	DHCR24	rs7374	rs718265	0.935
rs7374		rs638944	0.734	0.075
rs718265		rs638944	0.763	0.260

En la Figura 21 se muestran los valores de D' en forma de esquema obtenidos para el gen de la 24-dehidrocolesterol reductasa. En ella, se observa la existencia de un desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs7374 y rs718265 del gen de la 24-dehidrocolesterol reductasa ($D'=0.935$, $r^2=0.271$), lo que indica que un bloque de 3 kb que incluye a estos dos polimorfismos se hereda en forma conjunta y no al azar, además de que puede haber un gen cercano a ambos locus que es que pudiese estar asociado con la enfermedad.

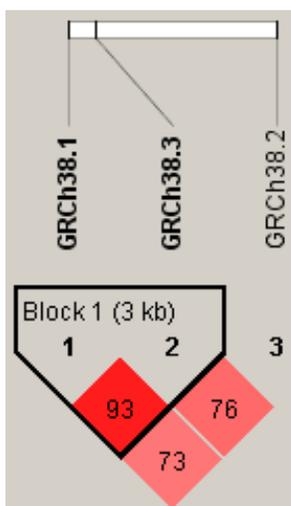


Figura 21. Esquema de desequilibrio de ligamiento para el gen DHCR24. Donde GRCh38.1 corresponde al polimorfismo rs7374, GRCh38.3 al rs718265 y GRCh38.2 al rs638944

12.6 Corrección por Ancestría

Utilizando el programa SNPStats⁹⁷ se obtuvo el análisis de los polimorfismos que inicialmente cumplieron con los valores de p y OR establecidos pero ahora tomando en cuenta la proporción de ancestría (Anexo 5 y 6) obtenida del programa Structure¹⁰² correspondiente al valor para la subpoblación Amerindia. Como se muestra en la Tabla 15, las diferencias encontradas en los polimorfismos siguen conservándose. Esto nos indica, que el polimorfismo rs4646954 localizado en el gen de la enzima degradadora de insulina pudiese estar asociado con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en la población Mexicana y que los datos obtenidos no se vieron afectados por la estructura de la mezcla étnica de la población.

Tabla 15. Análisis de resultados corregido por ancestría

Gen	Polimorfismo	Modelo	Genotipo	Ajuste género + edad				Ajuste género + edad + ancestría			
				Ca	Co	p	OR (95% CI)	Ca	Co	p	OR (95% CI)
IDE	rs3758505	Codominante	AA	13 (29.6%)	25 (58.1%)		1.00	14 (28%)	27 (58.7%)		1.00
			CA	27 (61.4%)	18 (41.9%)	0.010	0.39 (0.15—0.99)	30 (60%)	18 (39.1%)	0.017	0.35 (0.14—0.87)
			CC	4 (9.1%)	0 (0%)		0.00 (0.00—NA)	6 (12%)	1 (2.2%)		0.10 (0.01—1.01)
		Dominante	AA	13 (29.6%)	25 (58.1%)	0.019	1.00	14 (28%)	27 (58.7%)	0.009	1.00
			CA-CC	31 (70.5%)	18 (41.9%)			0.34 (0.13—0.85)	36 (72%)		
		Sobredominante	AA-CC	17 (38.6%)	25 (58.1%)	0.130	1.00	20 (40%)	28 (60.9%)	0.087	1.00
	CA		27 (61.4%)	18 (41.9%)	0.50 (0.20—1.22)			30 (60%)	18 (39.1%)		
	rs4646953	Codominante	AA	57 (70.4%)	78 (81.2%)		1.00	68 (72.3%)	80 (80.8%)		1.00
			AG	22 (27.2%)	18 (18.8%)	0.034	0.49 (0.23—1.04)	24 (25.5%)	19 (19.2%)	0.051	0.53 (0.26—1.11)
			GG	2 (2.5%)	0 (0%)		0.00 (0.00—NA)	2 (2.1%)	0 (0%)		0.00 (0.00—NA)
		Dominante	AA	57 (70.4%)	78 (81.2%)	0.032	1.00	68 (72.3%)	80 (80.8%)	0.051	1.00
			AG-GG	24 (29.6%)	18 (18.8%)			0.45 (0.22—0.94)	26 (27.7%)		
Sobredominante		AA-GG	59 (72.8%)	78 (81.2%)	0.078	1.00	70 (74.5%)	80 (80.8%)	0.11	1.00	
	AG	22 (27.2%)	18 (18.8%)	0.52 (0.25—1.08)			24 (25.5%)	19 (19.2%)			0.56 (0.27—1.15)
rs4646954	Codominante	GG	42 (51.9%)	32 (33.3%)		1.00	49 (52.1%)	34 (34.3%)		1.00	
		AG	32 (39.5%)	49 (51%)	0.016	2.20 (1.13—4.28)	36 (38.3%)	49 (49.5%)	0.012	2.25 (1.18—4.30)	
		AA	7 (8.6%)	15 (15.6%)		3.31 (1.18—9.27)	9 (9.6%)	16 (16.2%)		3.15 (1.22—8.16)	
	Dominante	GG	42 (51.9%)	32 (33.3%)	0.0058	1.00	49 (52.1%)	34 (34.3%)	0.0038	1.00	
		AG-AA	39 (48.1%)	64 (66.7%)			2.40 (1.28—4.51)	45 (47.9%)			65 (65.7%)
	Sobredominante	GG-AA	49 (60.5%)	47 (49%)	0.100	1.00	58 (61.7%)	50 (50.5%)	0.081	1.00	
AG		32 (39.5%)	49 (51%)	1.67 (0.90—3.09)			36 (38.3%)	49 (49.5%)			1.69 (0.93—3.06)
DHCR24	rs7374	Codominante	AA	43 (53.1%)	63 (65.6%)		1.00	48 (51.1%)	66 (66.7%)		1.00
			GA	38 (46.9%)	32 (33.3%)	0.059	0.51 (0.27—0.95)	46 (48.9%)	32 (32.3%)	0.015	0.43 (0.23—0.81)
			GG	0 (0%)	1 (1%)		NA (0.00—NA)	0 (0%)	1 (1%)		NA (0.00—NA)
		Dominante	AA	43 (53.1%)	63 (65.6%)	0.042	1.00	48 (51.1%)	66 (66.7%)	0.0093	1.00
			GA-GG	38 (46.9%)	33 (34.4%)			0.52 (0.28—0.98)	46 (48.9%)		
		Sobredominante	AA-GG	43 (53.1%)	64 (66.7%)	0.029	1.00	48 (51.1%)	67 (67.7%)	0.0061	1.00
GA	38 (46.9%)		32 (33.3%)	0.50 (0.26—0.94)	46 (48.9%)			32 (32.3%)	0.42 (0.23—0.79)		

XIII. DISCUSIÓN

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de dos tipos de lesiones a nivel cerebral que son las PN y las MNF. Las PN son depósitos extracelulares del péptido amiloide beta mientras que las MNF son el resultado de la acumulación al interior de las neuronas de la proteína de unión a microtúbulos Tau. Su presencia en tejido cerebral de pacientes es el diagnóstico que confirma la enfermedad. Actualmente, no existe un diagnóstico temprano de la enfermedad por lo que es importante estudiar aquellos genes que pudiesen predisponer a su desarrollo. En este sentido se ha reportado la participación de varios genes asociados con el desarrollo de esta patología, tal es el caso de los evaluados en este estudio. Puesto que la mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en poblaciones caucásicas y dado la poca existencia de estudios de este tipo en nuestra población, se planteó analizar la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido en los genes de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), enzima degradadora de insulina (IDE), 24-dehidrocolesterol reductasa (DHCR24) y protocadherina 11 (PCDH11) en una muestra de 94 pacientes con diagnóstico de demencia tipo Alzheimer y 100 individuos correspondientes al grupo control.

Para ello se realizó un estudio de asociación genética, lo cual permitió establecer una relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado entre un grupo de casos y controles, a manera de que se obtuvieran las frecuencias alélicas, frecuencias genotípicas y haplotipos de los genes estudiados.

Este tipo de estudios considera que la diferencia en la frecuencia alélica y genotípica entre el grupo de casos con respecto al control es indicativo de la existencia de variantes en la secuencia que pueden incrementar el riesgo de presentar una enfermedad. En este mismo sentido, la presencia de un desequilibrio de ligamiento (LD) entre loci podría ser indicador de que exista otra variante alélica que es la que estaría más asociada con la enfermedad¹⁰³, esto significa que hay una asociación no aleatoria entre alelos de polimorfismos vecinos y por lo tanto, son heredados juntos como consecuencia de su proximidad en un cromosoma.

La primera observación que se realizó fue la presencia de diferencias significativas en 5 polimorfismos al analizar su frecuencia alélica y genotípica, sin embargo al evaluar el equilibrio de Hardy-Wienberg se encontró que el polimorfismo rs4362 del gen de la enzima convertidora de angiotensina no seguía el EHW en el grupo control. Por lo tanto se decidió eliminar dicho polimorfismo en los análisis siguientes, debido a que en estudios de asociación el grupo control debe seguir este modelo al ser una representación de la población general. Sin embargo, en el caso de que en el grupo de pacientes este principio no se cumpla, podría sugerir que ese gen podría tener relación con la enfermedad.

Para la determinación de las combinaciones alélicas o haplotipos es necesario el estudio de múltiples polimorfismos de un solo nucleótido ya que el objetivo es escanear el gen en búsqueda de aquellas variantes que pudiesen ser significativas, esto indicaría que su presencia confiere susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. En el caso de los polimorfismos estudiados, se encontraron 6 haplotipos que se presentaron con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con diagnóstico de demencia tipo Alzheimer. Así mismo, se encontraron 3 combinaciones alélicas presentes en el gen de la enzima degradadora de insulina, de los cuales uno se presenta con mayor frecuencia en el grupo de casos y 2 en ambos grupos de estudio.

Para el gen de la enzima convertidora de angiotensina, en este estudio que comprendió tres polimorfismos rs4343, rs4362 y rs4291, no se encontró ningún alelo y genotipo asociado con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en la población Mexicana. Los resultados concuerdan con aquellos realizados por Feulner TM et al¹⁰⁴ en la población Alemana, donde se encontró que no existía asociación en los polimorfismos rs4343 y rs4362 que estuvieran asociados con el desarrollo de la EA en dicha población. Sin embargo, un estudio¹⁰⁵ que genotipificó varios polimorfismos localizados en este gen en cinco diferentes poblaciones caucásicas encontró que el polimorfismo rs4291 y la combinación alélica AAT correspondiente a los polimorfismos rs4343, rs4291 y rs1800764 están asociados con la enfermedad. Por otra parte, un estudio realizado en población Árabe¹⁰⁶ concluyó, tras el análisis en la búsqueda de haplotipos, que es posible la existencia de una variante asociada con la enfermedad de Alzheimer en una región que comprende los polimorfismos inserción/delección (I/D), rs4343 y rs4351.

La enzima degradadora de la insulina, es una de las principales enzimas que participa en la degradación del péptido A β , por tal motivo, el gen que la codifica es uno de los genes candidatos asociados con el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Con respecto a este gen, los resultados que se obtuvieron en el laboratorio correspondiente a la población Mexicana muestran que el alelo C ($p=0.002$, $OR=2.57$) en el polimorfismo rs3758505, el genotipo homocigoto para el alelo A ($p=0.016$, $OR=3.31$) y el genotipo heterocigoto A/G ($p=0.016$, $OR=2.20$) en el polimorfismo rs4646954 en un modelo de herencia codominante fueron más frecuentes en el grupo de pacientes con demencia tipo Alzheimer en comparación con el grupo control, además de que su presencia confiere un incremento considerable ($OR>1$) en el riesgo de presentar la enfermedad. Por el contrario, un estudio realizado en la población Han¹⁰⁷ en China encontró que el alelo A ($p=0.007$) y el genotipo homocigoto para A ($p=0.005$, $OR=1.84$) en el polimorfismo rs3758505 y el alelo G ($p=0.012$) y el genotipo homocigoto para G ($p=0.022$, $OR=1.64$) en el polimorfismo rs4646954 se presentaron con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Además, observaron que los alelos A y G se encontraban en desequilibrio de ligamiento ($D'=0.838$, $r^2=0.702$). Así mismo, en la búsqueda de combinaciones alélicas en ambos polimorfismos vieron que el haplotipo CA se presentó con mayor frecuencia en el grupo control confiriéndole un efecto protector mientras que el haplotipo AG, parecía estar más asociado con el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Respecto a lo obtenido en este estudio, se encontró tres combinaciones alélicas en el gen de la enzima degradadora de insulina. El haplotipo CAGC ($p=1.896E-07$) se presentó en el 24 por ciento de la población con diagnóstico de demencia tipo Alzheimer, AAAC en el 14 por ciento ($p=0.0005$, $OR=16$) y CGGC en el 7 por ciento ($p=0.0308$, $OR=7$), éstos dos últimos también estuvieron presentes en el uno por ciento del grupo control; estos resultados sugieren que su presencia incrementa el riesgo en 16 y 7 veces de desarrollar la EA puesto que aunque se presentan en ambos grupos su presencia en el grupo de casos es mayor.

La 24-dehidrocolesterol reductasa protege a las neuronas de la toxicidad del péptido A β_{42} . Por tal motivo se decidió analizar si la presencia de ciertos polimorfismos pudiese estar asociada con el desarrollo de la EA. Un estudio realizado en la población Finlandesa¹⁰⁸ demostró la existencia de una asociación entre este gen y la EA, para ello se genotipificaron cuatro polimorfismos (rs638944, rs600491, rs718265 y rs7374) encontrando que los hombres

que tuviesen el alelo T en el polimorfismo rs600491 tenían un incremento en el riesgo de presentar la EA ($p=0.004$, $OR=1.7$), mientras que en las mujeres no encontraron que la presencia de alguno de los polimorfismos evaluados estuviese asociado con la enfermedad. Así mismo, encontraron dos combinaciones alélicas correspondientes a los SNP rs638944 y rs600491 siendo el haplotipo TC considerado como protector al presentarse con mayor frecuencia en el grupo control mientras que el haplotipo GC como de riesgo, al ser más frecuente en los casos.

Los resultados obtenidos en este estudio en pacientes mexicanos, sugieren que no existe ninguna asociación en los polimorfismos analizados ya que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio. Por otra parte, los resultados concuerdan con aquellos realizados en la población Canadiense¹⁰⁹ y en la población Americana¹¹⁰ donde no encontraron que los polimorfismos rs638944 y rs718265 tuviesen alguna asociación con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Con respecto al análisis de polimorfismos localizados en el gen de la protocadherina 11, en la población Mexicana no se encontró evidencia de que pudiera estar asociado con el desarrollo de la EA en los sujetos del género femenino. Estos resultados coinciden con estudios realizados en la población Española¹¹¹ y en la población Americana¹¹² en los cuales tampoco encontraron que polimorfismos en este gen estuviesen asociados con el desarrollo de la enfermedad. No obstante, existen reportes en la literatura que asocian al polimorfismo rs5984894, evaluado en este estudio, con la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Tal es el caso de un estudio realizado en la población caucásica Americana⁸³, donde encontraron que el polimorfismo rs5984894 está asociado con la susceptibilidad de presentar la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (LOAD).

En el estudio de genotipos multiloci en los 9 polimorfismos que se encontraban en equilibrio de Hardy-Wienberg, se encontró seis combinaciones que resultaron más frecuentes en el grupo de casos que en el de controles. La combinación AACAGCAGG se presentó en el once por ciento de los pacientes ($p=0.0004$), AAAAGCAAG en el 10 por ciento ($p=0.0012$), TGCAGCAGA en el 9 por ciento ($p=0.0022$), TGAAGCGGA en el 5 por ciento ($p=0.0029$) mientras que en el 4 por ciento AAAACAGGA y AACAGCAGA ($p=0.0439$). Estos resultados sugieren que su presencia puede asociarse con un incremento en la predisposición de

presentar la enfermedad en la población Mexicana. Sin embargo, para corroborar este planteamiento es necesario que los resultados se repliquen y compararlos con otras poblaciones.

Los estudios de asociación son una herramienta que permite la identificación de genes que confieran susceptibilidad al desarrollo de enfermedades complejas. Se dice que una enfermedad es compleja debido a que en su desarrollo se ven involucrados tanto factores genéticos como ambientales.¹¹³ La inclusión de datos incorrectos en un análisis genético puede dar lugar a conclusiones falsas, dificultad en la búsqueda e identificación de aquellos loci que pudieran resultar significativos además de ser un problema reconocido en el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante estudios genéticos.¹¹⁴ Por otro lado, existe una diferencia en la replicación de resultados entre poblaciones, en primer lugar dado el flujo genético que existe entre ellas y segundo, por errores de tipo II causados por el tamaño de la muestra o por la similitud entre las edades de ambos grupos, dado que existe la posibilidad de que en el grupo control los individuos en un futuro pudiesen presentar la enfermedad.^{115,116} Sin embargo, la asociación encontrada en el polimorfismo rs4646954 en el gen de IDE queda validada por la corrección por ancestría realizada dado que los valores de p y OR se conservan, esto significa que las proporciones de ancestría se encuentran distribuidas de manera homogénea entre los grupos de estudio. De esta forma, se puede decir que la presencia del genotipo homocigoto para el alelo A o del genotipo heterocigoto A/G en la población Mexicana confiere un incremento en la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

XIV. CONCLUSIÓN

El estudio de casos y controles reveló que el alelo C en el polimorfismo rs3758505, el genotipo homocigoto para el alelo A y el genotipo heterocigoto A/G en el polimorfismo rs4646954 del gen de la enzima degradadora de insulina se presentaron con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con diagnóstico de demencia tipo Alzheimer. Además, su presencia confiere un incremento de aproximadamente tres y dos veces, respectivamente, en el riesgo de desarrollar la enfermedad en nuestra población.

La presencia de alguna de las seis combinaciones alélicas (AAAAACAGA, AAAAGCAAG, AACAGCAGA, AACAGCAGG, TGAAGCGGA, TGCAGCAGA) obtenidas en el gen de la enzima convertidora de angiotensina, enzima degradadora de insulina y la 24-dehidrocolesterol reductasa pudiese significar un mayor riesgo a presentar la enfermedad de Alzheimer en la población Mexicana. Lo mismo sucede con el haplotipo CAGC en el gen de la enzima degradadora de insulina.

XV. REFERENCIAS

1. OPS. Demencia: una prioridad de salud pública. 2014.
2. Instituto Nacional de Geriátría; Secretaría de Salud. Plan de acción Alzheimer y otras demencias. 2014:54.
3. Yates D, McLoughlin DM. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Psychiatry*. 2007;7(1):1-5.
4. Campos-Peña V, Meraz Ríos MA. Marcadores moleculares de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Mex Neuroci*. 2006;7(4):293-299.
5. Blennow K, de Leon M, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006;368(9533):387-403.
6. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-259.
7. Braak E, Braak H. Staging of Alzheimer's Disease-Related Neurofibrillary Changes. *Neurobiol Aging*. 1995;16(3):271-278.
8. Verdile G, Fuller S, Atwood CS, Laws SM, Gandy SE, Martins RN. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: Still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacol Res*. 2004;50(4):397-409.
9. Selkoe DJ. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev*. 2001;81(2):741-766.
10. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*. 2010;77(1):32-42.
11. Friedhoff P, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E. Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1502(1):122-132.
12. Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Riczny J, Ripova D. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012;2012:731526.
13. Mietelska-Porowska A, Wasik U, Goras M, Filipek A, Niewiadomska G. Tau protein modifications and interactions: Their role in function and dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):4671-4713.
14. De Anda-Hernández MA, Lira-De León KI, Mena R, Campos-Peña V, Meraz-Ríos MA. Tau and Amyloid- β Conformational Change to β -Sheet Structures as Effectors in the Development of Alzheimer's Disease. In: Contreras D, ed. *Neuroscience - Dealing With Frontiers*,. InTech; 2012:363-388.
15. Morris, Meaghan, Mucke L. The Many Faces of Tau. *Neuron*. 2011;70(3):410-426.
16. Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, Arnold SE. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Arch Neurol*. 2004;61(3):378-384.
17. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12(3):189-198.
18. Morris J. Clinical Dementia Rating (CDR). *Neurology*. 1993;43(11):2412-2414.
19. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-

- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2011;7(3):263-269.
20. Masters CL, Cappai R, Barnham KJ, Villemagne VL. Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: Implications for neuroimaging and therapeutics. *J Neurochem.* 2006;97(6):1700-1725.
 21. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol.* 2014;88(4):640-651.
 22. Wolfe MS. Presenilin-1. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes.* Academic Press; 2013:273-278.
 23. Selkoe DJ. Presenilins, β -amyloid precursor protein and the molecular basis of Alzheimer's disease. *Clin Neurosci Res.* 2001;1:91-103.
 24. Zhang S, Zhang M, Cai F, Song W. Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. *Transl Neurodegener.* 2013;2(1):15.
 25. Wolfe MS. Presenilin-2. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes.* Academic Press; 2013:278-281.
 26. Thinakaran G, Koo EH. Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *J Biol Chem.* 2008;283(44):29615-29619.
 27. Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener.* 2006;1:5.
 28. Selkoe D. The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 1998;8(11):447-453.
 29. Meraz-Rios MA, Franco-Bocanegra D, Toral Rios D, Campos-Peña V. Early Onset Alzheimer's Disease and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:375968.
 30. Zhang X, Song W. The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid- β generation. *Alzheimers Res Ther.* 2013;5(5):46.
 31. Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(11):1505-1535.
 32. Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, et al. Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2015;12:32-46.
 33. Willem M, Lammich S, Haass C. Function, regulation and therapeutic properties of beta-secretase (BACE1). *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(2):175-182.
 34. Tolia A, De Strooper B. Structure and function of γ -secretase. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(2):211-218.
 35. Dries DR, Yu G. Assembly, maturation and trafficking of the γ secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2008;5(2):132-146.
 36. Lundkvist J, Näslund J. γ -Secretase: a complex target for Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7(1):112-118.
 37. Poirier J. Apolipoprotein E and cholesterol metabolism in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 2003;9(3):94-100.
 38. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways,

- pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(5):333-344.
39. Verghese PB, Castellano JM, Holtzman DM. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2011;10(3):241-252.
 40. Liu C-C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(9):106-118.
 41. van der Flier WM, Pijnenburg Y AL, Fox NC, Scheltens P. Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE ϵ 4 allele. *Lancet Neurol*. 2011;10(3):280-288.
 42. Higgins GA, Large CH, Rupniak HT, Barnes JC. Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease: A Review of Recent Studies. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997;56(4):675-685.
 43. Carrillo-Mora P, Luna R, Colín-Barenque L. Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:795375.
 44. Bates KA, Verdile G, Li Q-X, et al. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid- β peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry*. 2009;14(5):469-486.
 45. Majumdar A, Chung H, Dolios G, et al. Degradation of fibrillar forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by macrophages. *Neurobiol Aging*. 2008;29(5):707-715.
 46. Lee CYD, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm*. 2010;117(8):949-960.
 47. Deane R, Bell RD, Zlokovic BV. Clearance of amyloid- β peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009;8(1):16-30.
 48. Saido T, Leissring M. Proteolytic degradation of amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(6):a006379.
 49. Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res*. 2006;98(4):463-471.
 50. Reaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12(4):157-162.
 51. Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol*. 2003;4(8):225-229.
 52. Oba R, Igarashi A, Kamata M, Nagata K, Takano S, Nakagawa H. The N-terminal active centre of human angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide. *Eur J Neurosci*. 2005;21(3):733-740.
 53. Gard PR, Rusted JM. Angiotensin and Alzheimer's disease: therapeutic prospects. *Expert Rev Neurother*. 2004;4(1):87-96.
 54. Elkins JS, Douglas VC, Johnston SC. Alzheimer disease risk and genetic variation in ACE: a meta-analysis. *Neurology*. 2004;62(3):363-368.
 55. Lehmann DJ, Cortina-Borja M, Warden DR, et al. Large meta-analysis establishes the ACE insertion-deletion polymorphism as a marker of Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol*. 2005;162(4):305-317.

56. Narain Y, Yip A, Murphy T, et al. The ACE gene and Alzheimer's disease susceptibility. *J Med Genet.* 2000;37:695-697.
57. Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting Enzyme Degrades Alzheimer Amyloid β -Peptide ($A\beta$); Retards $A\beta$ Aggregation, Deposition, Fibril Formation; and Inhibits Cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2001;276(51):47863-47868.
58. Hemming ML, Selkoe DJ. Amyloid $A\beta$ -protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol Chem.* 2005;280(45):37644-37650.
59. Barnes N, Cheng C, Costall B, Naylor R, Williams T, Wischik C. Angiotensin converting enzyme density is increased in temporal cortex from patients with Alzheimer's disease. *EurJPharmacol.* 1991;200:289-292.
60. Miners JS, Ashby E, Van Helmond Z, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) levels and activity in Alzheimer's disease, and relationship of perivascular ACE-1 to cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008;34(2):181-193.
61. Qiu WQ, Folstein MF. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging.* 2006;27(2):190-198.
62. Farris W, Mansourian S, Leissring M a, et al. Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein. *Am J Pathol.* 2004;164(4):1425-1434.
63. Hulse RE, Ralat LA, Tang W-J. Structure, Function, and Regulation of Insulin-Degrading Enzyme. *Vitam Horm.* 2009;80:635-648.
64. Cohen P, Alessi DR, Cross DA. PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? The previous Datta Lectures were given by: F. Melchers (1st, 1986), N. Sharon (2nd, FEBS Lett. 217 (1987) 145–157); B.G. Malmström (3rd, FEBS Lett. 250 (1989) 9–21); J.C. Skou (4th, FEBS Lett. *FEBS Lett.* 1997;410(1):3-10.
65. Chang L, Chiang S-H, Saltiel AR. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. *Mol Med.* 2004;10(7-12):65-71.
66. Kim B, Feldman EL. Insulin resistance in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(3):133-141.
67. Kurochkin I V, Goto S. Alzheimer's β -amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett.* 1994;345:33-37.
68. Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, et al. Neurons Regulate Extracellular Levels of Amyloid β -Protein via Proteolysis by Insulin-Degrading Enzyme. *J Neurosci.* 2000;20(5):1657-1665.
69. Bernstein H, Ansorge S, Riederer P, Reiser M. Insulin-degrading enzyme in the Alzheimer's disease brain: prominent localization in neurons and senile plaques. *Neurosci Lett.* 1999;263:161-164.
70. Son SM, Shin HJ, Mook-Jung I. Insulin resistance and Alzheimer's disease. In: Zimring P, ed. *Topics in the Prevention, Treatment and Complications of Type 2 Diabetes.* InTech. ; 2011.
71. Dineley KT, Jahrling JB, Denner L. Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2014;72:92-103.

72. Neumann K, Rojo L, Navarrete L, Farias G, Reyes P, Maccioni R. Insulin Resistance and Alzheimers Disease: Molecular Links & Clinical Implications. *Curr Alzheimer Res.* 2008;5(5):438-447.
73. Bjorkhem I. Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(5):806-815.
74. Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease : the cholesterol connection. *Nat Rev Neurosci.* 2003;6(4):345-351.
75. Maulik M, Westaway D, Jhamandas JH, Kar S. Role of Cholesterol in APP Metabolism and Its Significance in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Mol Neurobiol.* 2013;47(1):37-63.
76. Paolo G Di, Kim T. Linking Lipids to Alzheimer's Disease : Cholesterol and Beyond. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(5):284-296.
77. Zerenturk EJ, Sharpe LJ, Ikonen E, Brown AJ. Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis. *Prog Lipid Res.* 2013;52(4):666-680.
78. Pedretti A, Bocci E, Maggi R, Vistoli G. Homology modelling of human DHCR24 (seladin-1) and analysis of its binding properties through molecular docking and dynamics simulations. *Steroids.* 2008;73(7):708-719.
79. Cramer A, Biondi E, Kuehnle K, et al. The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and A β generation in vivo. *EMBO J.* 2006;25(2):432-443.
80. Greeve I, Hermans-Borgmeyer I, Brellinger C, et al. The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress. *J Neurosci.* 2000;20(19):7345-7352.
81. Coughlin GM, Kurrasch DM. Protocadherins and Hypothalamic Development: Do They Play An Unappreciated Role? *J Neuroendocrinol.* 2015;27(6):544-555.
82. Redies C, Vanhalst K, Roy F van. δ -Protocadherins: unique structures and functions. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(23):2840-2852.
83. Carrasquillo M, Zou F, Pankratz V, et al. Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009;41(2):192-198.
84. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet.* 2005;6(2):109-118.
85. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.* 2006;7(10):781-791.
86. Pearson TA. How to Interpret a Genome-wide Association Study. *JAMA.* 2008;299(11):1335-1344.
87. Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, et al. Replicating genotype – phenotype associations. *Nature.* 2007;447(June):655-660.
88. Gómez M, Danglot-Banck C, Huerta S GG. El estudio de casos y controles: su diseño, análisis e interpretación, en investigación clínica. *Rev Mex Pediatr.* 2003;70(5):257-263.
89. Khoury MJ, Little J, Gwinn M, Ioannidis JP a. On the synthesis and interpretation of consistent but weak gene-disease associations in the era of genome-wide association

- studies. *Int J Epidemiol.* 2007;36(2):439-445.
90. Manolio TA, Bailey-Wilson JE, Collins FS. Genes, environment and the value of prospective cohort studies. *Nat Rev Genet.* 2006;7:812-820.
 91. Thomas DC, Witte JS. Point: Population stratification: A problem for case-control studies of candidate-gene associations? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(6):505-512.
 92. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8611-8616.
 93. Burchard EG, Borrell LN, Choudhry S, et al. Latino Populations : A Unique Opportunity for the Study of Race, Genetics, and Social Environment in Epidemiological Research. *Am J Public Heal.* 2005;95(12):2161-2168.
 94. Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Rosas-Carrasco O, et al. Evaluation of inflammation-related genes polymorphisms in Mexican with Alzheimer's disease: a pilot study. *Front Cell Neurosci.* 2015;9(May):1-10.
 95. Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet.* 2000;58(4):250-264.
 96. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics.* 2012;28(19):2537-2539.
 97. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006;22(15):1928-1929.
 98. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online.* 2005;1:47-50.
 99. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;21(2):263-265.
 100. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(12):e1002822.
 101. Bill HEC, Takanobu C, Kimberly M, et al. Mexican American ancestry-informative markers : examination of population structure and marker characteristics in European Americans , Mexican Americans , Amerindians and Asians. *Hum Genet.* 2004;114:263-271.
 102. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics.* 2000;155:945-959.
 103. Xu J, Turner A, Little J, Bleecker E, Meyers D. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet.* 2002;111(6):573-574.
 104. Feulner TM, Laws SM, Friedrich P, et al. Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. *Mol Psychiatry.* 2010;15(7):756-766.
 105. Kehoe PG, Katzov H, Feuk L, et al. Haplotypes extending across ACE are associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2003;12(8):859-867.
 106. Meng Y, Baldwin CT, Bowirrat A, et al. Association of polymorphisms in the Angiotensin-converting enzyme gene with Alzheimer disease in an Israeli Arab

- community. *Am J Hum Genet.* 2006;78(5):871-877.
107. Lv H, Jia L, Jia J. Promoter polymorphisms which modulate APP expression may increase susceptibility to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2008;29(2):194-202.
 108. Lämsä R, Helisalmi S, Hiltunen M, et al. The association study between DHCR24 polymorphisms and Alzheimer's disease. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144B(7):906-910.
 109. Hosford D, Barnes MR, Briley JD, et al. Candidate Single-Nucleotide Polymorphisms From a Genomewide Association Study of Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 2008;65(1):45-53.
 110. Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, et al. GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron.* 2007;54(5):713-720.
 111. Miar A, Alvarez V, Corao AI, et al. Lack of association between protocadherin 11-X/Y (PCDH11X and PCDH11Y) polymorphisms and late onset Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2011;1383:252-256.
 112. Beecham GW, Naj A, Gilbert JR, Haines JL, Joseph D, Pericak-vance MA. PCDH11X variation is not associated with late-onset Alzheimer disease susceptibility. *Psychiatr Genet.* 2010;20(6):321-324.
 113. Lewis CM, Knight J. Introduction to Genetic Association Studies. *Cold Spring Harb Protoc.* 2012:297-306.
 114. Hosking L, Lumsden S, Lewis K, et al. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(5):395-399.
 115. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet.* 2005;6(2):95-108.
 116. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev.* 2008;9(5):356-369.

ANEXOS

ANEXO 1. EXTRACCIÓN DE DNA Y PLASMA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA (QUIAGEN)

1. Extraer sangre periférica en tubos Vacutainer con EDTA o citratos
2. Transferir la sangre a tubos de 50 mL y medir el volumen total
3. Centrifugar los tubos a 4000 rpm, durante 12 minutos
4. Remover el plasma con una micropipeta cuidando de no tocar la interfase de células blancas. Se realizan tres alícuotas de 230 μ L de plasma y el plasma restante se alícuota en tubos eppendorf de 1.5 mL y se congelan hasta su uso.
5. Agregar al tubo falcon buffer de lisis de células rojas RBC (red blood cells), para completar un volumen de 45 mL y agitar por 15 minutos para favorecer la lisis de los eritrocitos.
6. El tubo se centrifuga por 10 minutos a 2000 rpm. Se aspira aproximadamente el 75% del sobrenadante y se agrega nuevamente buffer de lisis RBC. La pastilla se agita en vortex durante 1 minuto y nuevamente se agita durante 15 minutos.
7. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos el botón de células blancas. Desechar el sobrenadante y nuevamente se agita en el vortex la pastilla.
8. Se agregan aproximadamente 7.5 mL de solución de lisis (Cell lysis solution QUIAGEN) y se agita vigorosamente en el vortex durante 1 minuto.
9. Incubar en baño maría el tubo de DNA a 55°C por al menos 2 horas para romper la unión de proteínas-DNA.
10. Transcurrido el tiempo, agitar nuevamente con vortex y dejar enfriar a temperatura ambiente
11. Agregue 0.333 mL de QUIAGEN Protein Precipitation solution por cada 1 mL de Cell lysis solution al tubo de DNA y agite con vortex por 30 segundos.
12. Agitar por 30 minutos en el agitador.
13. Centrifugar a 4000 rpm durante 40 minutos para precipitar las proteínas.
14. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y limpio
15. Centrifugar nuevamente a 4000 rpm durante 40 minutos.
16. Transferir con mucho cuidado el sobrenadante a un nuevo tubo falcon ayudándose de una pipeta.

17. Esta solución contiene el DNA, el cual no es visible, por lo que se debe asegurar que no existan residuos insolubles flotando.
18. Agregar 2X etanol absoluto y mezcle invirtiendo el tubo varias veces, hasta que el DNA sea visible
19. Centrifugue a 2800 rpm para concentrar el DNA en una pastilla por 20 minutos.
20. Desechar el etanol y secar la pastilla de DNA por 15 minutos. Lave la tapa del tubo con agua destilada estéril.
21. Para disolver el DNA, agregue 0.2 mL de TE 1X por cada 1 mL de sangre total.
22. Colocar los tubos a TA en agitación ON para que el DNA se disuelva completamente.
23. Cuantificar el DNA y realizar alícuotas de 50 μ L a una concentración de 10ng/ μ L
24. El DNA restante, se congela hasta su uso

SOLUCIONES:

RBC o BLGR

0.15 M NH_4Cl

10 mM KHCO_3

1xTE

10 mM Tris-HCl, pH 8.0

1 mM EDTA, pH 8.0

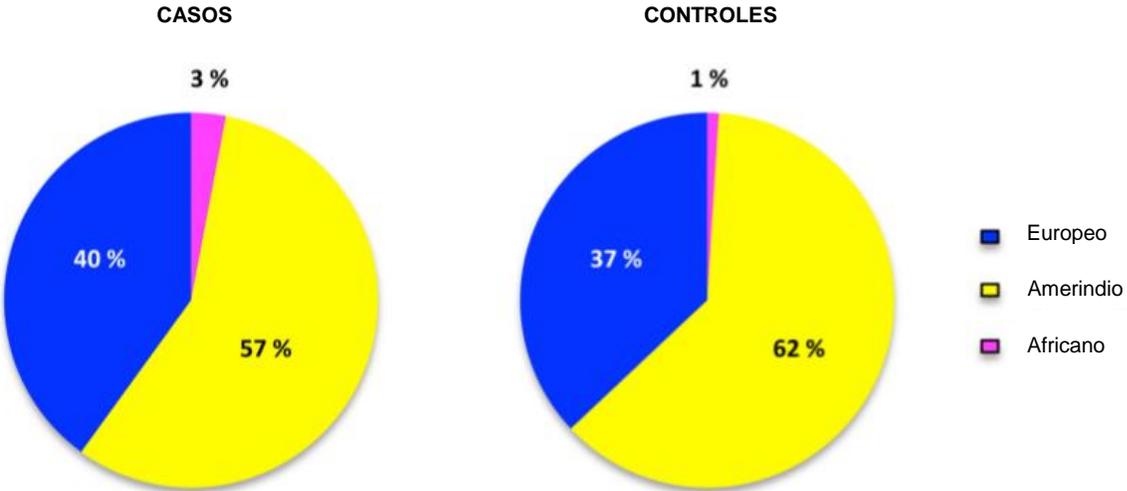
ANEXO 2. COMBINACIONES ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS EVALUADOS

Combinación	% Frecuencia		Combinación	% Frecuencia	
	Alzheimer	Controles		Alzheimer	Controles
AAAAAGAAA	1	0	TGCAACAGG	3	0
AAAAACAAG	2	0	TGCAGGAAG	1	0
AAAAACAGA	4	0	TGCAGCAGA	9	0
AAAAACGGA	3	0	TGCGGCGGG	1	0
AAAAGGGGA	2	0	AAAAACAGG	0	1
AAAAGCAAG	10	0	AAAAGGAAG	0	1
AAAAGCGGA	2	0	AAAAGCAGG	0	3
AAAGACGGA	1	0	AAAGGGAGA	0	1
AAAGGCAGG	2	0	AACAAGGGA	0	1
AACAACAGA	2	0	AACAACAGG	0	1
AACAACGAA	1	0	AACGGCAGG	0	1
AACAACGGA	2	0	AGAAGGAAG	0	2
AACAGGAAG	1	0	AGAAGCAAG	0	3
AACAGCAGA	4	0	AGAAGCAGA	0	1
AACAGCAGG	11	0	AGAGGCAAG	0	1
AACAGCGAG	2	0	TAAAGGAGG	0	1
AACGACGAA	1	0	TAAAGCAGA	0	1
AACGGGGGA	1	0	TAAAGCAGG	0	2
AACGGCAGA	2	0	TAAGACAGA	0	1
AACGGCGAA	1	0	TACAACAAG	0	1
AGAAACAAA	1	0	TACAACAGA	0	1
AGAAGCAAA	1	0	TACAACAGG	0	1
AGAGACAGG	1	0	TACAACGGA	0	1
AGAGGCGAA	1	0	TGAAGGAAG	0	1
AGCAACAGA	1	0	TGAAGCAAG	0	3
AGCAGGAGA	1	0	TGAAGCAGA	0	1
AGCAGCAAG	2	0	TGAGGCAGG	0	1
AGCAGCAGG	1	0	TGCAAGAGA	0	1
TAAGGCGAA	1	0	TGCAGGAGG	0	1
TACAGGGGG	1	0	AAAAGCAGA	4	12
TGAAAGGGA	1	0	AACAACAAG	3	2
TGAAACAAG	2	0	AGAAGCAGG	1	2
TGAAACAGG	1	0	TAAAGCAAG	1	1
TGAAGCGAG	1	0	TGAGGCAAG	4	1
TGAAGCGGA	5	0	TGCAACAAG	2	2

ANEXO 3. COMBINACIONES ALÉLICAS POR GEN; ACE, IDE Y DHCR24

Gen	Combinación	% Frecuencia		p	OR
		Alzheimer	Controles		
ACE	A A	62	49	0.065	1.70
	A G	10	15	0.286	0.63
	T A	2	8	0.052	0.23
	T G	27	29	0.753	0.91
IDE	A A A C	14	1	4.99E-04	16.12
	A A G G	2	6	0.150	0.32
	A A G C	26	26	1.000	1.00
	A G G C	8	3	0.122	2.81
	C A A C	15	9	0.286	1.59
	C A G G	5	1	0.098	5.21
	C G G C	7	1	0.031	7.45
	C A G C	24	0	1.90E-07	Indefinido
DHCR24	A A A	2	2	1.000	1.00
	A A G	32	31	0.879	1.05
	A G A	24	23	1.000	1.00
	A G G	18	27	0.128	0.59
	G A A	2	1	0.562	2.02
	G G A	21	16	0.364	1.40
	G G G	2	0	0.156	Indefinido

ANEXO 4. DISTRIBUCIÓN DE LAS ANCESTRÍAS EN AMBOS GRUPOS DE ESTUDIO



ANEXO 5. PROPORCIONES DE ANCESTRÍA AMERINDIA EN EL GRUPO CASOS

			Proporción				Proporción
id	género	edad	Amerindia	id	género	edad	Amerindia
1	F	65	0.496	48	M	91	0.041
2	M	82	0.979	49	M	69	0.698
3	F	61	0.944	50	F	68	0.384
4	M	62	0.116	51	F	62	0.983
5	M	83	0.726	52	M	86	0.015
6	F	76	0.987	53	F	76	0.913
7	F	65	0.031	54	F	64	0.971
8	F	65	0.244	55	F	76	0.347
9	F	85	0.504	56	M	77	0.961
10	F	68	0.892	57	F	69	0.164
11	M	81	0.405	58	F	70	0.390
12	M	75	0.037	59	F	75	0.022
13	F	80	0.006	60	F	71	0.157
14	F	67	0.182	61	M	68	0.902
15	F	76	0.908	62	F	78	0.989
16	F	64	0.966	63	F	73	0.960
17	F	65	0.952	64	M	60	0.019
18	M	75	0.159	65	F	75	0.716
19	F	81	0.752	66	M	60	0.967
20	F	70	0.032	67	F	65	0.702
21	F	74	0.070	68	F	83	0.970
22	F	72	0.717	69	F	81	0.919
23	M	66	0.013	70	F	87	0.013
24	F	65	0.819	71	F	70	0.592
25	M	89	0.967	72	F	76	0.935
26	M	61	0.143	73	M	64	0.981
27	F	60	0.399	74	F	82	0.990
28	F	76	0.971	75	F	78	0.942
29	F	76	0.820	76	F	75	0.938
30	F	76	0.860	77	F	70	0.969
31	F	76	0.916	78	F	76	0.009
32	F	76	0.768	79	M	83	0.015
33	M	67	0.132	80	F	89	0.976
34	F	100	0.097	81	F	95	0.321
35	F	76	0.791	82	F	76	0.101
36	F	89	0.243	83	M	85	0.976
37	M	82	0.416	84	M	76	0.811
38	F	76	0.990	85	M	76	0.451
39	F	84	0.015	86	F	88	0.125
40	M	84	0.176	87	F	87	0.009
41	F	89	0.040	88	F	85	0.466
42	M	73	0.969	89	M	82	0.026
43	F	79	0.985	90	M	76	0.247
44	M	70	0.021	91	F	92	0.019
45	F	85	0.936	92	F	88	0.767
46	F	83	0.916	93	F	73	0.351
47	M	70	0.467	94	F	91	0.824

ANEXO 6. PROPORCIONES DE ANCESTRÍA AMERINDIA EN EL GRUPO CONTROL

			Proporción				Proporción
id	género	edad	Amerindia	id	género	edad	Amerindia
95	F	75	0.969	145	F	64	0.125
96	F	43	0.911	146	F	77	0.154
97	F	51	0.418	147	M	75	0.751
98	F	28	0.108	148	F	70	0.983
99	M	37	0.035	149	F	60	0.489
100	F	79	0.855	150	F	69	0.342
101	M	73	0.981	151	F	69	0.161
102	M	68	0.986	152	F	56	0.983
103	F	75	0.938	153	M	76	0.425
104	F	57	0.808	154	M	73	0.966
105	F	75	0.018	155	F	60	0.046
106	M	67	0.989	156	M	63	0.692
107	F	75	0.990	158	F	79	0.984
108	M	60	0.790	159	F	73	0.134
109	M	68	0.988	160	M	60	0.073
110	M	68	0.907	161	M	78	0.091
111	F	73	0.015	162	M	85	0.926
112	M	69	0.536	163	F	76	0.029
113	F	73	0.809	164	F	75	0.018
114	F	56	0.579	165	M	72	0.006
115	M	75	0.989	166	F	65	0.911
116	M	74	0.165	167	F	93	0.940
117	F	69	0.769	168	F	82	0.087
118	F	65	0.951	169	F	72	0.938
119	M	66	0.934	170	F	69	0.793
120	F	75	0.009	171	M	82	0.032
121	M	81	0.047	172	F	81	0.156
122	M	76	0.958	173	M	69	0.923
123	M	71	0.911	174	F	60	0.942
124	F	70	0.940	175	F	62	0.981
125	F	69	0.388	176	M	65	0.853
126	F	89	0.074	177	F	88	0.771
127	F	75	0.332	178	F	76	0.964
128	M	86	0.295	179	M	82	0.495
129	M	87	0.017	180	M	83	0.048
130	M	86	0.403	181	F	85	0.172
131	F	91	0.983	182	F	82	0.247
132	M	80	0.015	183	F	73	0.006
133	F	76	0.985	184	F	68	0.110
134	F	82	0.736	185	M	69	0.030
135	F	87	0.860	186	F	70	0.180
136	F	85	0.965	187	F	59	0.024
137	M	80	0.499	188	F	62	0.679
138	F	71	0.915	189	F	73	0.340
139	M	90	0.049	190	F	76	0.328
140	F	81	0.916	191	M	77	0.182
141	F	100	0.984	192	F	68	0.082
142	F	70	0.692	193	F	74	0.581
143	M	77	0.911	194	F	80	0.174
144	F	67	0.423				