



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA
DEGRADACIÓN DE AMILOIDE BETA EN PACIENTES MEXICANOS CON LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y SU RELACIÓN CON APOE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

KARLA BATÚN BOLAÑOS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Profesor: EUCLIDES AVILA CHAVEZ

VOCAL: Profesora: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

SECRETARIO: Profesora: VICTORIA CAMPOS PEÑA

1er. SUPLENTE: Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

2° SUPLENTE: Profesora: FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO EXPERIMENTAL DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS,
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO
SUÁREZ”**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. VICTORIA CAMPOS PEÑA

SUSTENTANTE:

KARLA BATÚN BOLAÑOS

Índice General

Índice de Figuras.....	3
Índice de Tablas.....	4
1. ABREVIATURAS	5
2. RESUMEN	6
3. INTRODUCCIÓN.....	7
4. ANTECEDENTES.....	8
4.1. Demencias.....	8
4.2. Enfermedad de Alzheimer	8
4.2.1. Diagnóstico.....	9
4.2.2. Características macroscópicas y microscópicas de la Enfermedad de Alzheimer.....	10
4.2.2.1. Marañas Neurofibrilares	13
4.2.2.2. Placas neuríticas y placas difusas	15
4.2.2.2.1. Degradación de amiloide.....	18
4.2.2.2.1.1. Neprilisina	18
4.2.2.2.1.2. Enzima convertidora de angiotensina	20
4.2.2.2.1.3. Enzima degradadora de insulina	22
4.2.3. Subtipos de la EA	24
4.2.3.1. EA familiar	24
4.2.3.1.1. Presenilina	24
4.2.3.1.2. Proteína precursora de amiloide beta	25
4.2.3.2. EA de inicio tardío	25
4.2.3.2.1. Apolipoproteína E	25
4.3. Estudios de asociación genética	27
4.3.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	28
5. HIPÓTESIS.....	30
6. OBJETIVOS	30
6.1. Objetivo general	30
6.2. Objetivos particulares.....	30
7. METODOLOGÍA.....	31
7.1. Grupos de estudio.....	31
7.2. Obtención de DNA genómico	33

7.2.1.	SNP's analizados	33
7.2.2.	PCR en tiempo real	35
7.3.	Análisis estadístico	38
7.4.	Asignación de genotipos de ApoE.....	40
8.	RESULTADOS	42
8.1.	Equilibrio de Hardy-Weinberg	42
8.2.	Frecuencias alélicas.....	44
8.3.	Frecuencias genotípicas	45
8.4.	Combinaciones multiloci y haplotipos	46
8.5.	Desequilibrio de ligamiento	47
8.6.	Genotipos de ApoE.....	49
9.	DISCUSIÓN	52
10.	CONCLUSIONES	58
11.	REFERENCIAS	59
12.	ANEXOS	65
	Anexo 1. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE UNA MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA.....	65
	Anexo 2. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE NEP Y ACE. LOS VALORES DE P, OR Y EL INTERVALO DE CONFIANZA CORRESPONDEN A LOS OBTENIDOS POR MEDIO DE Epi Info™	67
	Anexo 3. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS EVALUADOS OBTENIDAS POR SNPStats.....	68
	Anexo 4. COMBINACIONES MULTILOCI OBTENIDAS PARA LOS POLIMORFISMOS EVALUADOS.	69
	Anexo 5. HAPLOTIPOS OBTENIDOS PARA LOS POLIMORFISMOS EVALUADOS.	71

Índice de Figuras

FIGURA 1. COMPARACIÓN ENTRE CEREBROS DE UN INDIVIDUO SANO Y UNO QUE PRESENTA LA EA.	10
FIGURA 2. ETAPAS DE LA DISTRIBUCIÓN DE DEPÓSITOS DE AMILOIDE).	12
FIGURA 3. ETAPAS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS MNF.	13
FIGURA 4. MARAÑAS NEUROFIBRILARES.	14
FIGURA 5. VÍAS DE PROCESAMIENTO DE LA PPAB.	16
FIGURA 6. PLACA NEURÍTICA.	17
FIGURA 7. ESQUEMA DE LA LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE NEP EN EL CEREBRO..	19
FIGURA 8. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.	20
FIGURA 9. SE OBSERVA LA LOCALIZACIÓN DE LOS 3 DOMINIOS DE PROTEASA DE IDE.	23
FIGURA 10. ISOFORMAS DE APOE.	26
FIGURA 11. GENOTIPIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL CON SONDAS TAQMAN™	36
FIGURA 12. GRÁFICO DE DISPERSIÓN.	37
FIGURA 13. ESQUEMA DE DESEQUILIBRIO PARA EL GEN DE ACE. ...	49
FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS DE APOE EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.	50

Índice de Tablas

TABLA 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DEL GRUPO DE PACIENTES CON EA.	32
TABLA 2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DEL GRUPO CONTROL.	32
TABLA 3. EDAD Y GÉNERO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.	32
TABLA 4. SNP'S ANALIZADOS.	34
TABLA 5. CONDICIONES DE REACCIÓN DE PCR.	38
TABLA 6. SNP'S UTILIZADOS PARA DESIGNAR EL GENOTIPO DE APOE.	40
TABLA 7. GENOTIPOS Y CAMBIOS DE AMINOÁCIDOS ASOCIADOS AL ESTATUS ALÉLICO DE APOE.	40
TABLA 8. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.	43
TABLA 9. COMPARACIÓN ENTRE FRECUENCIAS ALÉLICAS DE IDE. .	44
TABLA 10. COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS PARA EL GEN DE NEP.	45
TABLA 11. COMBINACIÓN MULTILOCI.	46
TABLA 12. HAPLOTIPOS DE IDE.	47
TABLA 13. VALORES DE D' Y R ² PARA LOS GENES DE NEP, ACE E IDE.	48
TABLA 14. COMPARACIÓN ENTRE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.	50
TABLA 15. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA PRESENCIA DEL ALELO E4 D DE APOE Y EL POLIMORFISMO RS4646954 DE IDE.	51

1. ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
SNC	Sistema nervioso central
MMSE	Mini mental state examination
CDR	Clinical dementia rate
MNF	Marañas neurofibrilares
PN	Placas neuríticas
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos
Aβ	Amiloide beta
PPAβ	Proteína precursora de amiloide beta
aa	Aminoácido
NEP	Neprilisina
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
IDE	Enzima degradadora de insulina
RNA _m	RNA mensajero
ROS	Especies reactivas de Oxígeno
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT1-R	Receptor de angiotensina tipo 1
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
ApoE	Apolipoproteína E
LDL	Lipoproteína de baja densidad
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
SNP's	Polimorfismos de un solo nucleótido
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico

2. RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa derivada de la presencia de marañas neurofibrilares y placas neuríticas, estas últimas formadas por el péptido amiloide beta ($A\beta$). Actualmente se conoce la participación de genes en el desarrollo de la EA como son el que codifica a la neprilisina (NEP), la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la enzima degradadora de insulina (IDE), y también se reconoce que el principal factor de riesgo en la EA de origen **tardío es la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E (ApoE)**. En este proyecto se genotipificaron 12 polimorfismos de un solo nucleótido (**SNP's**) pertenecientes a **3 genes relacionados con la degradación de $A\beta$** , así como el genotipo de ApoE por medio de PCR en tiempo real en 2 grupos de estudio, uno de pacientes y uno de sujetos control.

Se encontró que en el polimorfismo rs3758505 del gen de IDE, el alelo C aumenta hasta 2 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad. En el polimorfismo rs1025192 del gen de NEP, el genotipo heterocigoto puede aumentar el riesgo de desarrollar la EA. Se obtuvieron 163 combinaciones multiloci de las cuales solo una resultó significativa. La combinación CAG del gen de IDE está relacionada a un incremento en el riesgo de desarrollar la EA de hasta 16 veces. Existe un desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs4343 y rs4362 del gen de ACE. **La presencia del alelo $\epsilon 4$ ApoE confiere un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad en combinación con el genotipo heterocigoto del polimorfismo rs4646954 del gen de IDE.**

3. INTRODUCCIÓN

Las demencias son un conjunto de patologías que se presentan no sólo en edades avanzadas, sino también como consecuencia de un accidente o asociadas con otro tipo de enfermedades. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la de mayor prevalencia a nivel mundial, representando el 60-70% (1). Según el Reporte Mundial de Alzheimer del 2016, en nuestro país hasta el 2015, 800 mil habitantes padecían la enfermedad (2).

Actualmente no existe una cura y el diagnóstico definitivo es post mortem. En los últimos años, la investigación se ha concentrado en el desarrollo de nuevas técnicas para mejorar el diagnóstico diferencial de las demencias, así como el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos más efectivos y con menos efectos secundarios.

Se han estudiado diferentes biomoléculas involucradas con la enfermedad con el fin de facilitar su diagnóstico y ha sido posible identificar diversas mutaciones en genes específicos involucrados con la patogénesis. Los estudios de asociación, entre casos y controles, permiten evaluar si en una población en específico, la presencia de una variante alélica interviene con la enfermedad (3). En este proyecto, se investigó si la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido asociados con la degradación de amiloide beta, podrían estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Del mismo modo se planteó la identificación del genotipo de la Apolipoproteína E en pacientes de la población mexicana.

4. ANTECEDENTES

4.1. Demencias

Los trastornos neurológicos representan aquellas enfermedades que afectan el sistema nervioso central (SNC) y periférico. Las demencias son un conjunto de patologías que pueden o no estar relacionadas con el envejecimiento, se caracterizan por la pérdida de memoria, deterioro cognitivo y conductual, así como en el lenguaje, y se presentan de manera progresiva en el individuo. En diciembre del 2017, la Organización Mundial de la Salud estimó que aproximadamente 50 millones de habitantes a nivel mundial, sufre de algún tipo de demencia de los cuales, el 60-70% presenta la Enfermedad de Alzheimer (EA) (1). En México, datos estadísticos señalan que en el 2015 había 800 mil habitantes con la EA, de los cuales más del 60% eran mujeres. Asimismo, se predijo que para el 2030, el número de casos en la población se elevaría a 1.5 millones (2).

4.2. Enfermedad de Alzheimer

La EA es el tipo de demencia más común a nivel mundial. Es una patología que se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria, deterioro cognitivo y conductual, debido a la neurodegeneración progresiva en el cerebro. La enfermedad no sólo afecta al individuo en cuestión, sino también a sus familiares o amistades debido al grado de dependencia que se genera. Funciones básicas de la vida cotidiana se van deteriorando, al grado que es necesaria la asistencia para asearse

o comer; el costo de la manutención aumenta y a largo plazo, puede llegar a ser necesaria asistencia médica continua.

4.2.1. Diagnóstico

Actualmente el diagnóstico definitivo es post-mortem; sin embargo, una aproximación se logra a través de estudios de imagen, junto con el historial clínico.

Las pruebas de imagen que se utilizan en la actualidad, incluyen tomografía computarizada y la resonancia magnética. El estudio del estado mental se basa en una serie de pruebas asociadas a la memoria y a la cognición, aparte de una evaluación psicológica para descartar problemas como depresión o estrés. Las evaluaciones más utilizadas son el mini-mental, o MMSE por sus siglas en inglés, y el mini-cog.

- El MMSE consiste en una serie de preguntas realizadas por un profesional cuyo puntaje final establece su grado de salud mental. La puntuación máxima es de 30, de 20-24 indica una demencia leve, de 13-20 una demencia moderada y menor a 12 indica una demencia severa. El promedio de una persona con EA suele decaer 2-4 puntos cada año (4).
- El mini-cog consiste en 2 tareas asignadas por el médico que son: recordar nombres de 3 objetos y mencionarlos minutos después; y dibujar un reloj con los 12 números en las posiciones correctas e indicando un horario asignado por el evaluador (5).

Otro test que se realiza es:

- El Clinical dementia rating (CDR) de Hughes en el cual se evalúa la orientación, memoria, juicio y resolución de problemas, vida social, hogar y aficiones y cuidado personal. La puntuación va de 1-3 y 3 representa el mayor grado de demencia (6).

4.2.2. Características macroscópicas y microscópicas de la Enfermedad de Alzheimer

A nivel macroscópico, se observa una disminución de la masa cerebral, resaltando la reducción de volumen en la zona de la corteza entorrinal y el hipocampo, así como el ensanchamiento de los ventrículos laterales (Figura 1) (7).

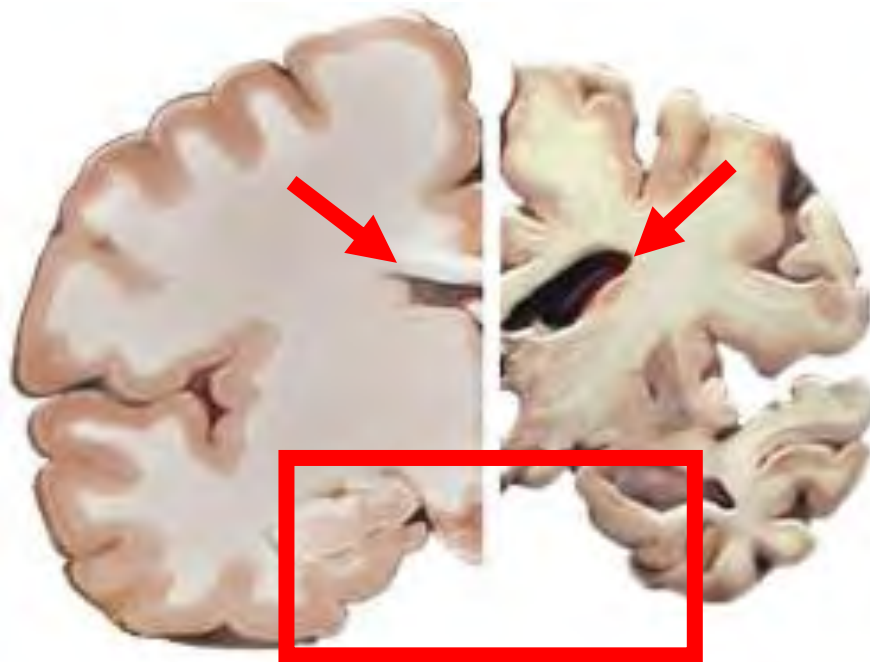


Figura 1. Comparación entre cerebros de un individuo sano (izquierda) y uno que presenta la EA (derecha). Se observa la disminución de masa cerebral principalmente en la zona del hipocampo (recuadro), así como el ensanchamiento de los ventrículos laterales (flechas). Modificado de NIA-NIH. 2016 (8).

A nivel microscópico, se observa neurodegeneración por la presencia de marañas neurofibrilares (MNF), formadas por agregados intracelulares de la proteína Tau en estado hiperfosforilado, y placas neuríticas (PN), formadas por la acumulación del péptido amiloide beta en estado fibrilar. Asimismo, se observan astrocitos reactivos y células de la microglía activadas (9).

De acuerdo con la progresión de la enfermedad, en 1991 Braak, H. y Braak, E. describieron que la acumulación tanto de MNF y de PN va cambiando de localización en el cerebro y aumentando con respecto al tiempo. Se distinguen 3 estados (A, B, C) para las PN y 6 estados para las MNF (I-VI) (10).

Los depósitos de amiloide se localizan principalmente en la corteza. En la etapa A hay una baja densidad de amiloide en la isocorteza, lóbulos frontal, temporal y occipital sin formación en el hipocampo. En la etapa B, la densidad de depósitos de amiloide aumenta cubriendo casi toda el área isocortical sin llegar a la zona sensorial y motora. En la etapa C aumenta la densidad de depósitos cubriendo las zonas pertenecientes y asociadas a la isocorteza, así como la zona sensorial y motora (Figura 2) (10).

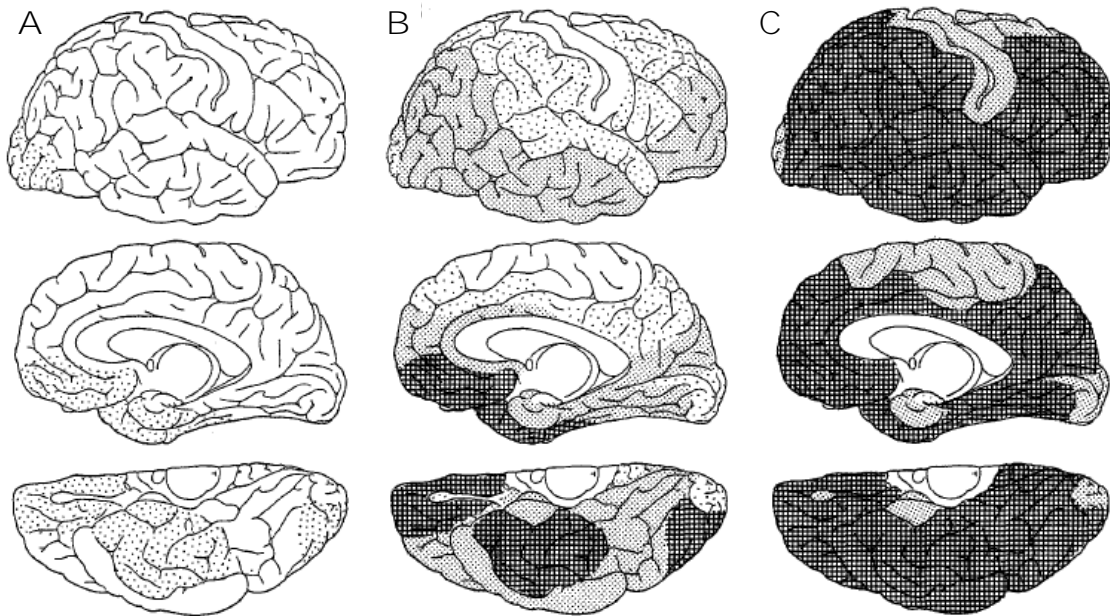


Figura 2. Etapas de la distribución de depósitos de amiloide: Etapa A donde los depósitos se encuentran principalmente en las porciones basales de la isocorteza. Etapa B, los depósitos se encuentran distribuidos prácticamente en todas las zonas asociadas a la isocorteza, el hipocampo se encuentra comprometido. Etapa C, los depósitos ya cubrieron toda la isocorteza incluyendo el centro motor y sensorial. El oscurecimiento está relacionado a la densidad de depósitos de amiloide Braak, H., E., Braak. 1991 (10).

Las MNF se encuentran distribuidas desde la zona entorrinal hacia la zona isocortical y básicamente se dividen en 3 etapas: transentorrinal (estados I-II), límbica (estados III-IV) e isocortical (estados V-VI). En las etapas I-II inicia el desarrollo de MNF en la zona transentorrinal y la entorrinal, así como CA1 del hipocampo. En las etapas III-IV, la producción de MNF aumenta cubriendo la zona entorrinal hacia las primeras capas de la isocorteza, así como CA1, amígdala, tálamo y claustrum cubriendo el área correspondiente al sistema límbico. En las etapas V-VI, hay total cobertura de la zona entorrinal, así como del sistema límbico y hay extensión hacia la isocorteza (Figura 3) (10).

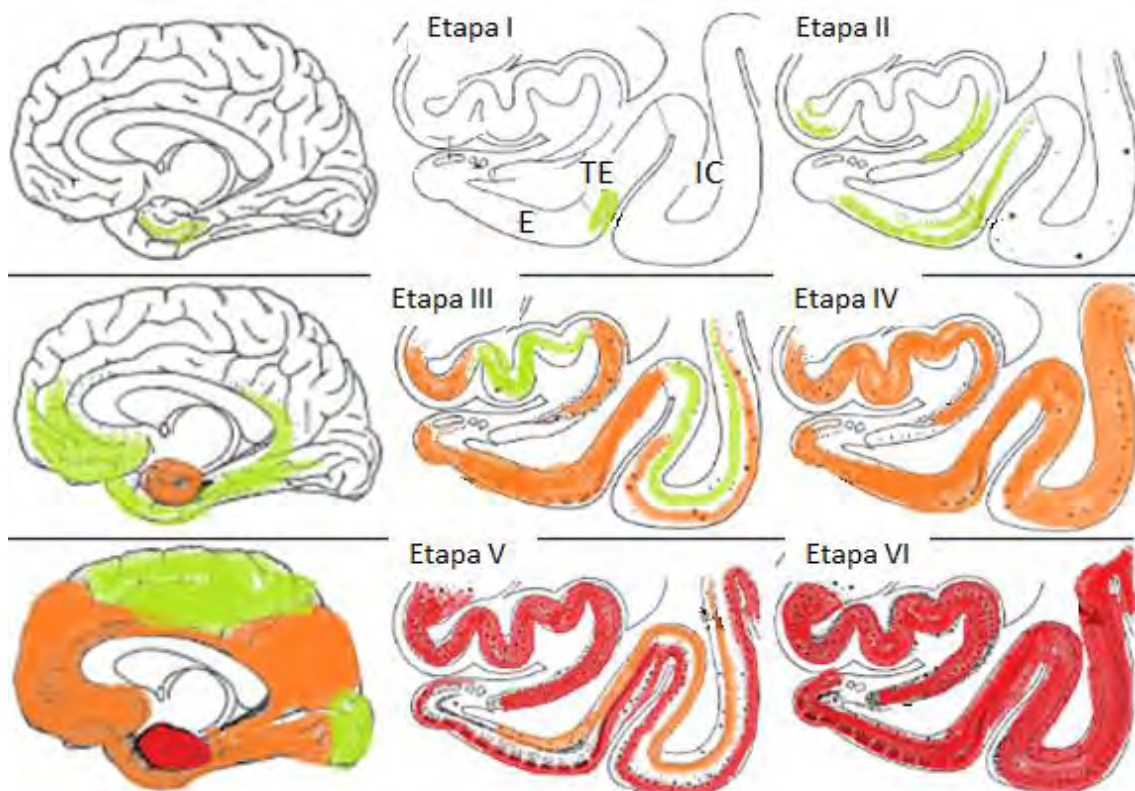


Figura 3. Etapas de la distribución de las MNF. En las etapas I-II se observan alteraciones en la zona entorrinal. En las etapas III-IV se ven envueltas las zonas entorrinal y transentorrinal, así como amígdala, tálamo e hipocampo correspondientes al sistema límbico. En las etapas V-VI hay destrucción isocortical. E= zona entorrinal, TE= zona transentorrinal e IC= isocorteza. La coloración está relacionada con la densidad de las MNF (Verde→Naranja→Rojo). Modificado de Braak, H., E., Braak. 1991 (10).

4.2.2.1. Marañas Neurofibrilares

Son agregados intracelulares de la proteína Tau en estado hiperfosforilado. La proteína Tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP).

Tau se asocia a los microtúbulos formando estructuras que sirven como soporte del citoesqueleto neuronal, sin embargo, al hiperfosforilarse no se asocia evitando así la estabilización del microtúbulo. En estado desfosforilado, Tau se une a los microtúbulos para estabilizarlos.

Cuando Tau está hiperfosforilada, se disocia de los microtúbulos y adopta una forma similar a un clip lo que la hace susceptible a alcanzar una estructura β -plegada. Este cambio conformacional conduce a la proteína a ensamblarse en dímeros, posteriormente en oligómeros, protómeros, hasta la formación de filamentos helicoidales apareados y finalmente las MNF (11).

Se distinguen 3 etapas de las MNF: Pre-MNF, MNF maduras y MNF extracelulares. Las pre-MNF se observan difusas, el núcleo neuronal, se mantiene céntrico y las dendritas aún mantienen su forma. En la MNF madura, se observa cómo se desplaza al núcleo hacia la periferia del soma y hay degeneración de las dendritas. Por último, las MNF extracelulares son aquellas que se observan en el medio extracelular tras la muerte celular (Figura 4) (9).

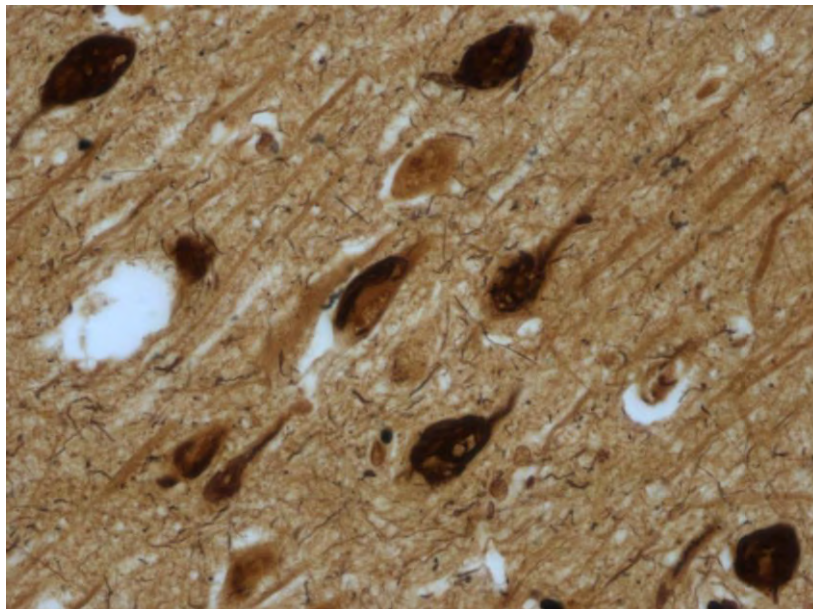


Figura 4. Marañas neurofibrilares. Por medio de una tinción de Bielschowsky, se pueden observar en forma de gota y con una coloración café oscuro las MNF. Cortesía de Campos-Peña, V.

4.2.2.2. Placas neuríticas y placas difusas

Se deben a la acumulación de péptido amiloide beta ($A\beta$) **en estado fibrilar**, el cual, es producido por el procesamiento proteolítico de la **proteína precursora de amiloide beta (PPA β)**. La PPA β presenta 2 vías de procesamiento: la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica.

En la vía no amiloidogénica, la secuencia correspondiente al péptido $A\beta$ es **escindida por la mitad mediante la α -secretasa**, impidiendo la **formación del péptido $A\beta$ y liberando al espacio extracelular** un fragmento soluble. El fragmento anclado a la membrana es posteriormente procesado por el **complejo γ -secretasa**.

En el caso de la vía amiloidogénica, la acción conjunta de la β -secretasa y la γ -secretasa producen el $A\beta$. **Estos cortes dan lugar a fragmentos** de aproximadamente 42 aminoácidos (aa) y 4 kDa, que son liberados al espacio extracelular (Figura 5).

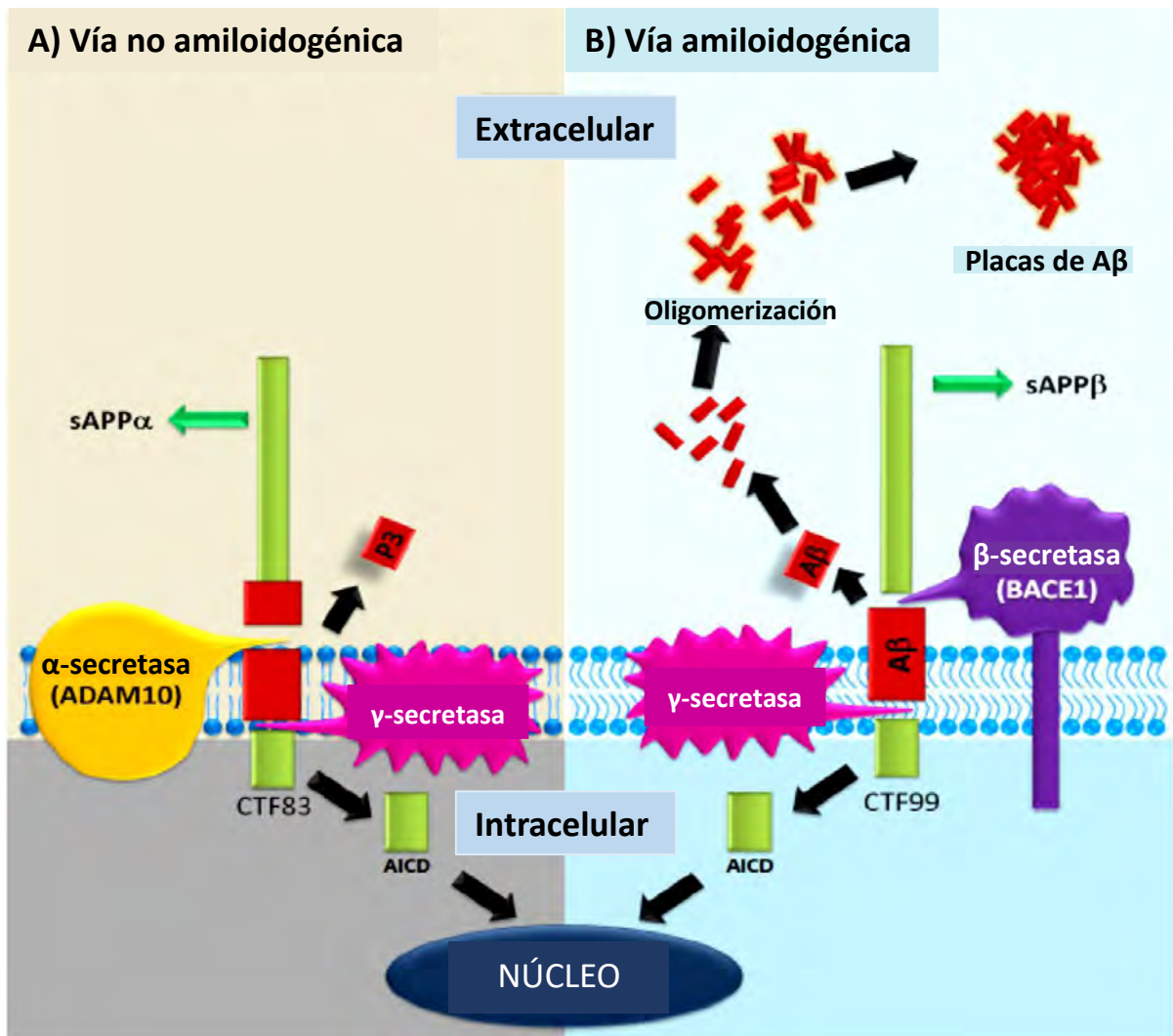


Figura 5. Vías de procesamiento de la PPAβ. En la vía no amiloidogénica (izquierda), la acción de la α-secretasa no permite la formación del Aβ. En la vía amiloidogénica (derecha), la β-secretasa y la γ-secretasa escinden al inicio y al final de la secuencia que corresponde al Aβ (rojo). Modificado de Campos-Peña, V. Gómez, R., Meraz-Ríos, MA. 2014 (12).

El Aβ producido en la vía amiloidogénica puede encontrarse en forma de monómero, o asociarse para formar oligómeros o fibras los cuales pueden formar agregados (13). El amiloide cuya longitud es de 42 aa (Aβ42) es tóxico ya que presenta alta hidrofobicidad y es más propenso a formar fibras. Estas placas neuríticas se observan principalmente en la isocorteza, asimismo, se encuentran rodeadas de astrocitos

reactivos y células de la microglia activadas, que son indicativas de inflamación.

La visualización de las placas neuríticas difiere de las placas difusas de $A\beta$ en los niveles de compactación de los agregados, la pérdida de sinapsis, así como la asociación a los marcadores de inflamación (astrocitos y glía) (Figura 6).

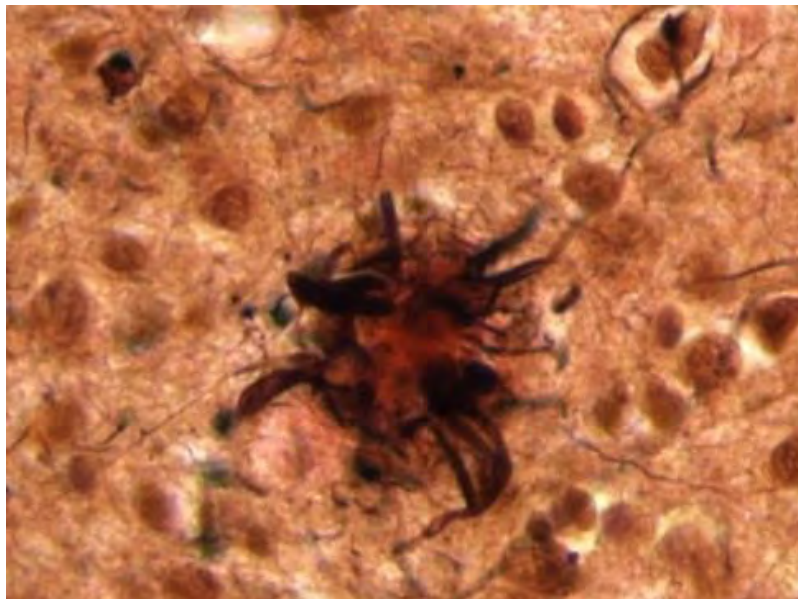


Figura 6. Placa neurítica. Por medio de una doble tinción de Bielschowsky junto con una inmunohistoquímica con anticuerpo específico para $A\beta$, se puede observar en el centro el depósito de $A\beta$ que se encuentra rodeado de neuritas distróficas. Cortesía de Campos-Peña, V.

Las placas difusas son depósitos de amiloide fibrilar amorfas y sin estar asociadas a marcadores de inflamación en comparación con las placas neuríticas; comúnmente no están asociadas a la degeneración ni a la EA ya que se observan de manera normal en sujetos sanos (9, 14-16).

4.2.2.2.1. Degradación de amiloide

El $A\beta$ producido a bajas concentraciones en el cerebro es capaz de regular la neurotransmisión y la memoria. Al igual que con otras proteínas, se requiere de un balance entre su producción y su eliminación. Se han identificado varias enzimas involucradas en la **degradación de $A\beta$ como son la Neprilisina (NEP), la Enzima convertidora de angiotensina (ACE) y la Enzima degradadora de insulina (IDE) (17-19).**

4.2.2.2.1.1. Neprilisina

El gen que codifica a esta proteína se localiza en el brazo largo del cromosoma 3 y está formado por 29 exones (20). Se conoce que NEP comparte 55% de homología con otra enzima identificada como NEP2 (21). Es una metaloproteasa de zinc de 750 aa que tiene una masa de 97-110 kDa. Es una glicoproteína de unión a membrana plasmática con función de ectoenzima en la cual, el extremo carboxilo presenta el sitio catalítico y se encuentra en el espacio extracelular (22). El dominio catalítico presenta un motivo HExxH formado por histidina, glutamato, 2 aa inespecíficos e histidina; el Zn se une en los residuos de histidina, mientras que el ácido glutámico, tiene una función catalítica (17).

Esta enzima degrada péptidos con un tamaño <5 kDa y es capaz de degradar **tanto monómeros como oligómeros de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$.**

La NEP se encuentra distribuida en todo el organismo: vellosidades intestinales, células epiteliales del riñón, neutrófilos, timocitos, pulmón, próstata, neuronas pre y post-sinápticas (Figura 7) (21, 23).

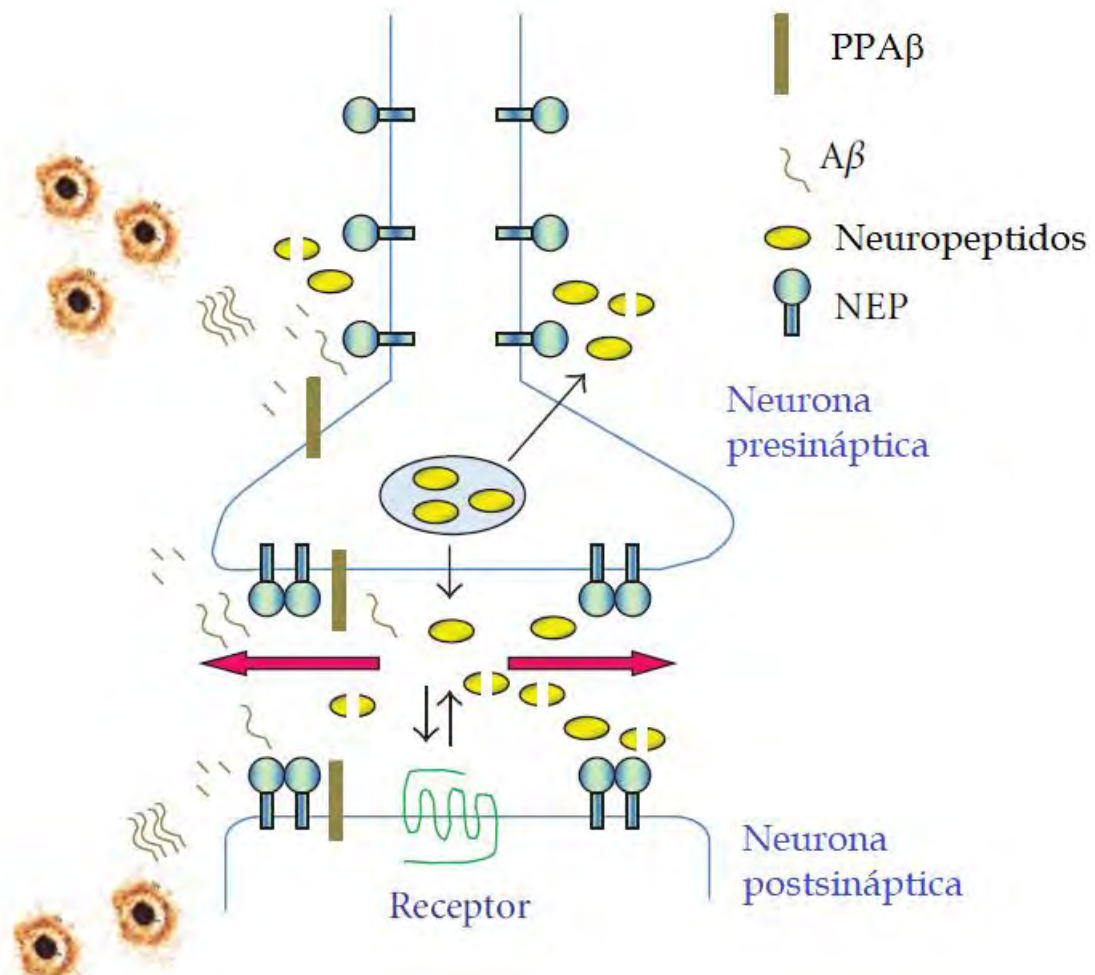


Figura 7. Esquema de la localización y función de NEP en el cerebro. NEP se encarga de degradar los péptidos que ya cumplieron con su función, entre ellos, al péptido A β para evitar su acumulación y posterior agregación. Modificado de Nalivaeva, NN., et. al. 2012 (23).

Se ha observado que en hipocampo y corteza de pacientes con EA, existe una disminución en los niveles del RNAm y de la enzima de NEP (17, 23-25). Ratones que sobreexpresan el gen de NEP han mostrado una disminución en los niveles de A β , por el contrario, ratones con una delección en dicho gen presentan un aumento en los niveles extracelulares de A β (18, 26).

4.2.2.2.1.2. Enzima convertidora de angiotensina

El gen que codifica a ACE se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 y está formado por 26 exones (27). La ACE al igual que NEP, es una metaloproteasa de Zn, tiene un tamaño de 1306 aa y una masa de 149 kDa (28, 29). Se conoce una proteína conocida como ACE2 que comparte 49% de homología con ACE (30). En el organismo, ACE se presenta en 2 isoformas ambas codificadas por el mismo gen: la forma somática (sACE) que posee 2 dominios catalíticos localizados en los extremos carboxilo y amino de la proteína, respectivamente, y la forma testicular o germinal (gACE) con solo un dominio HExxH (31). Su función principal es participar en la transformación de angiotensina I (Ang I) en angiotensina II (Ang II) para la regulación del sistema vasopresor renina-angiotensina-aldosterona (Figura 8).

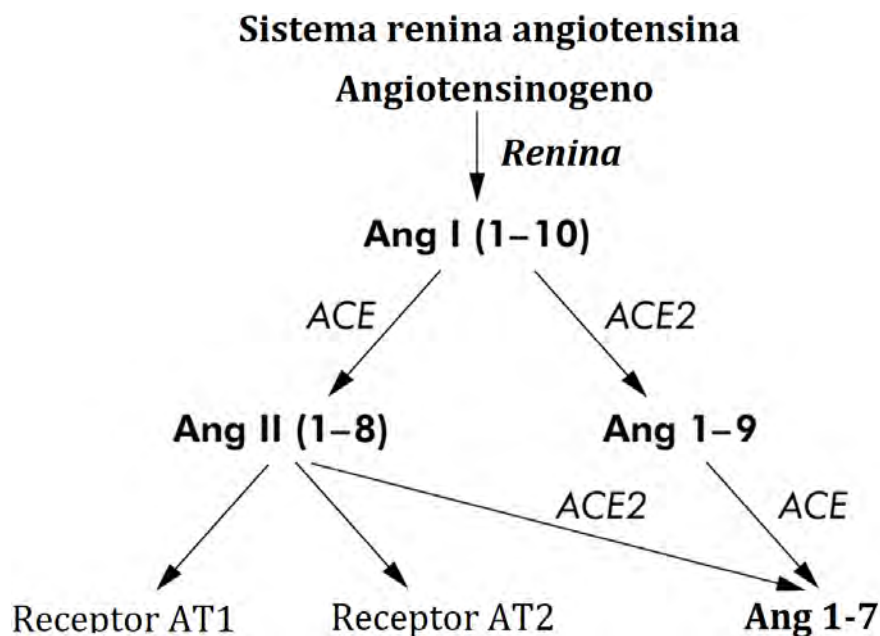


Figura 8. Sistema renina angiotensina. ACE degrada Ang I para formar Ang II que es capaz de estimular la liberación de aldosterona para la regulación de la presión sanguínea. Modificado de Paizis, G., et. al. 2005 (32).

La ACE se encuentra distribuida en diferentes tejidos del organismo, principalmente en pulmón, riñón, corazón, tracto gastrointestinal y próstata distribuida en células del endotelio vascular. La actividad de esta enzima ocurre de manera endocrina o local; en el SNC, ocurre principalmente en el hipocampo y en la corteza frontal. La ACE es capaz de degradar diferentes proteínas, entre ellas, la Ang I, la bradicinina que actúa **como vasodilatador, y A β 42** (33).

La inflamación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) están asociados a la neurodegeneración en pacientes con EA. Se ha reportado que la Ang II se une al AT1-R (receptor de angiotensina tipo 1) e induce neuroinflamación, debido a la activación de la microglía, así como a la producción de ROS. Dado que la conversión de Ang I a Ang II se lleva a cabo por ACE, se han realizado estudios para probar el impacto que tiene su inhibición (34). En ratones transgénicos, el uso de captopril, un inhibidor de ACE que atraviesa la barrera hematoencefálica, disminuye la activación de la microglia al igual que la liberación de citocinas proinflamatorias. También en ratones transgénicos que sobre expresan PPA β , la administración de captopril **retrasa la acumulación del péptido A β y la neurodegeneración** relacionada a este (35).

4.2.2.2.1.3. Enzima degradadora de insulina

La IDE es una proteína cuyo gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 y está formado por 34 exones (36). Es una metaloproteasa de 1019 aa, con una masa de aproximadamente 110 kDa que requiere un tiol (-SH) para su actividad. Adopta una conformación parecida a una almeja la cual se abre o cierra para permitir la entrada y salida del sustrato (37). La IDE pertenece a la **familia de las metaloproteasas "inverzincinas" ya que tiene un motivo HxxEH que funge como sitio catalítico al igual que el motivo HExxH de otras metaloproteasas como NEP y ACE (18, 38-41).** La IDE puede estar en la membrana celular, en el citosol, endosomas, peroxisomas, mitocondria o ser secretada al medio extracelular; se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, principalmente en el hígado, músculos y cerebro.

La IDE participa de manera normal en el organismo para la degradación de insulina excedente y así regular los niveles de glucosa. También es capaz de degradar bradicinina y otros péptidos, preferentemente <6 kDa, como lo son monómeros de A β secretado de neuronas y células de la microglia. Es en el espacio extracelular donde se ha observado **que es capaz de degradar péptidos, entre ellos el A β (17).** La secreción de IDE es realizada a través de exosomas en el cual es requerida la participación de un motivo específico, el hexapéptido EKPPHY. La IDE posee 3 dominios de proteasa: el dominio I y II se localizan cerca del extremo amino (aa 74-212 y 236-418 respectivamente) y el dominio

III cerca del extremo carboxilo (aa 706-889) (Figura 9). En el tercer dominio se encuentra el hexapéptido EKPPHY que es homólogo a SlyX en bacterias; la delección de este motivo disminuye casi por completo la secreción de IDE probando la importancia que tiene en el proceso (42, 43).

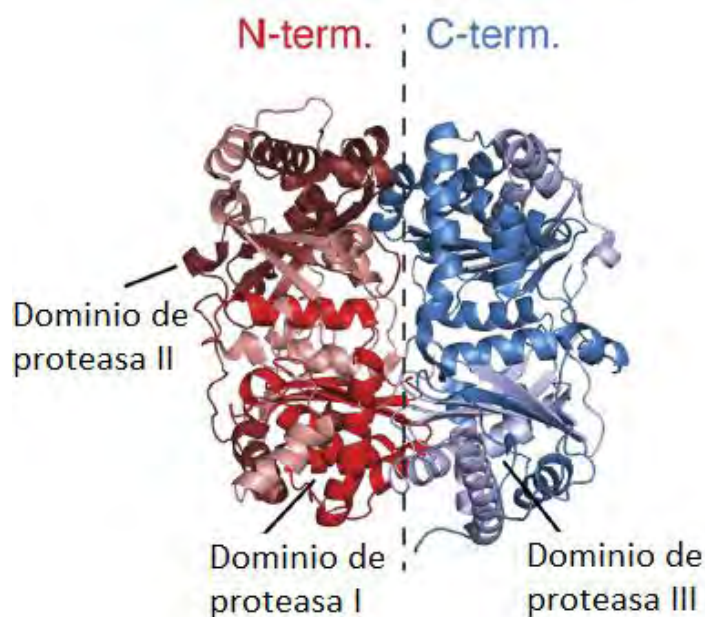


Figura 9. Se observa la localización de los 3 dominios de proteasa de IDE. El dominio I y II en el extremo amino responsables de la actividad catalítica y el dominio III en el extremo carboxilo involucrado en la unión al sustrato. Modificado de Glebov, K., Schütze, S. y Walter, J. 2011 (42).

La IDE es la principal proteasa encargada de degradar el **A β** en el humano. En pacientes con la EA, los niveles de la enzima van disminuyendo en relación con el estado de Braak que presente el individuo, lo que a su vez se observa en una disminución en la degradación de **A β** y un aumento en la acumulación en el espacio extracelular. Esta disminución en los niveles de la proteína se ha visto que no dependen de alteraciones a nivel del RNAm, lo que sugiere que la vida media de la enzima o la secreción están comprometidos (44).

4.2.3. Subtipos de la EA

La EA se puede clasificar en 2 tipos: de tipo familiar o de inicio temprano y esporádico o de inicio tardío.

4.2.3.1. EA familiar

La EA de tipo familiar se debe a mutaciones de carácter autosómico dominante en genes que codifican para la presenilina 1 o 2, de la γ -secretasa, o en el gen de la PPA β (45).

4.2.3.1.1. Presenilina

La presenilina (PS) constituye el centro catalítico de la γ -secretasa la cual es capaz de realizar cortes a nivel transmembranal de la PPA β (46). Tiene un tamaño de 50 kDa y consiste en 9 dominios transmembranales. Las mutaciones en PS son las que principalmente intervienen en la EA de tipo familiar.

La PS1 se localiza en el cromosoma 14 y se han reportado mutaciones de cambio de sentido o de paro principalmente, en básicamente todos los exones (4-12) así como mutaciones puntuales, inserción o deleción de fragmentos en el intrón 8 que pueden alterar el splicing (47).

La PS2 es homóloga a la PS1. El gen que codifica a esta proteína se localiza en el cromosoma 1 y hasta el momento se han reportado 15 mutaciones involucradas con la EA (48).

4.2.3.1.2. Proteína precursora de amiloide beta

El gen que codifica a la PPA β **se localiza en el cromosoma 21**. La PPA β , que da origen al péptido neurotóxico, es una proteína transmembranal con diferentes isoformas obtenidas por splicing alternativo por lo que su tamaño varía entre 350 y 770 aa, señalando que la forma de 695 aa es la que se expresa predominantemente en neuronas y contiene al A β . **En la actualidad se conocen 27 mutaciones involucradas con la EA**, principalmente en los exones 16 y 17, con la principal consecuencia de aumentar la producción de A β (49, 50).

4.2.3.2. EA de inicio tardío

Se presenta en adultos mayores de 65 años y es la de mayor prevalencia. Se sabe que el principal factor de riesgo genético es la **presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E**.

4.2.3.2.1. Apolipoproteína E

El gen que codifica a la apolipoproteína E (ApoE) se localiza en el cromosoma 19. Es una lipoproteína con un tamaño de 299 aa y un peso molecular de aproximadamente 34 kDa. Se conocen 3 variantes **alélicas de la ApoE: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, donde $\epsilon 4$ está relacionada a la EA de inicio tardío**. La diferencia entre las distintas variantes alélicas, se debe a los aminoácidos que se codifican en las posiciones 112 y 158 de la proteína: E2 tiene cisteínas en ambas posiciones, E3 tiene cisteína en

la posición 112 y arginina en la posición 158 y E4 presenta arginina en ambas posiciones (Figura 10) (51).

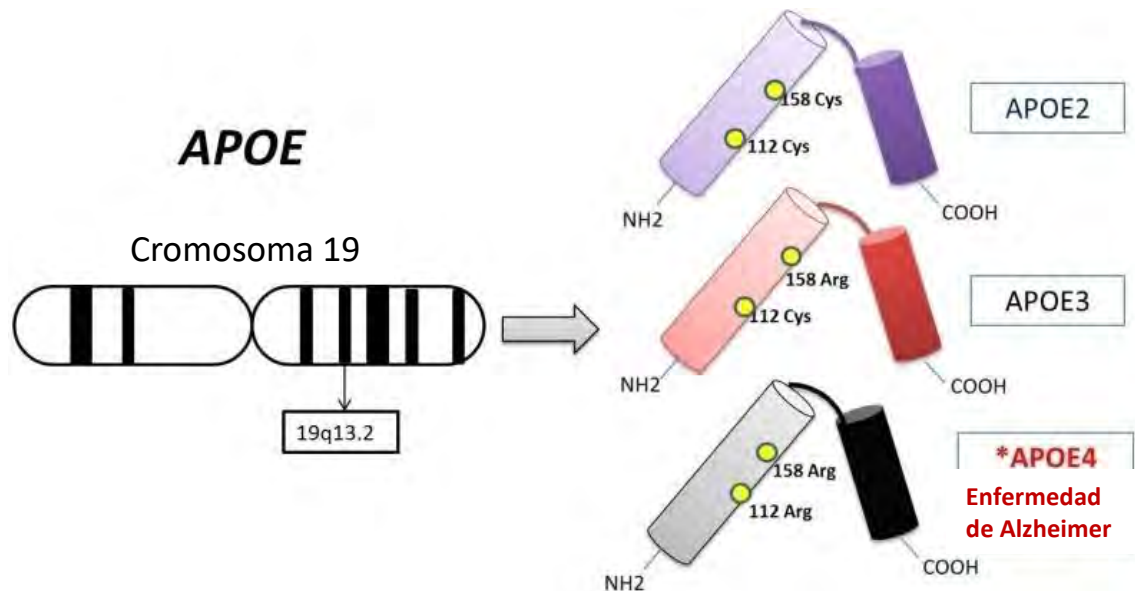


Figura 10. Isoformas de ApoE. En la imagen se muestra la localización del gen en el cromosoma, así como las 3 isoformas de acuerdo con los aminoácidos en las posiciones 112 y 158. Modificado de Gabriel-Ortiz, G., et. al. 2015 (52).

ApoE está relacionada al transporte de lípidos y colesterol en el hígado, astrocitos y células gliales del SNC. Además del transporte, se sabe que participa en procesos de inflamación, actúa como receptor de LDL y quilomicrones, participa en el aclaramiento de quilomicrones remanentes y VLDL remanentes, actúa como antioxidante y, en el SNC, tiene participación en el crecimiento y reparación celular (51).

El alelo ϵ 2 se considera protector contra la EA mientras que el alelo ϵ 4 es el de mayor riesgo genético para la enfermedad (53). El alelo ϵ 3 es el más común en la población. Se ha reportado que la presencia del alelo ϵ 4 está asociado a un mayor riesgo de padecer la EA, tanto de inicio temprano como de inicio tardío, incrementando hasta 12 veces

el riesgo si se presentan dos copias del alelo (54). La presencia del **alelo $\epsilon 4$** , también se ha asociado con la disminución en la edad de inicio de la EA, así como que la formación de PN en individuos que presentan este alelo, es mayor en comparación con aquellos sujetos que no son portadores (55, 56).

Finalmente, **la presencia del alelo $\epsilon 4$ esta relacionada con el deterioro** en la plasticidad sináptica, en el aumento de la muerte celular, el aumento en el estrés oxidante y la disminución de la actividad de antioxidantes, la exacerbación de procesos inflamatorios, entre otros (57).

4.3. Estudios de asociación genética

Las enfermedades multifactoriales, como el nombre lo indica, no solo dependen de la parte genética involucrada, sino también de los factores ambientales o la relación con otras patologías. En el caso de la EA, el diagnóstico es meramente post-mortem, por lo que la búsqueda de información para desarrollar con mayor precisión y de manera oportuna el diagnóstico resulta ser una de las principales metas en la investigación. Diversos estudios han evidenciado genes involucrados con la EA; una de las principales herramientas son los estudios de asociación de genoma completo (GWAS por su nombre en inglés) ya que permiten ligar la participación de ciertos genes a una enfermedad en una población en específico. Estos estudios consisten en la asociación de marcadores genéticos, como son los polimorfismos

de un solo nucleótido (SNP's por su nombre en inglés), a una enfermedad de acuerdo con un análisis de todo el genoma del individuo sin suponer una hipótesis a priori (3, 58, 59).

Al limitar el margen de información proporcionada por los GWAS, se pueden realizar estudios más certeros con genes candidatos identificados previamente. Existen 3 tipos de estudios: casos y controles, de cohorte o por tríos. Estos estudios evalúan las frecuencias **genotípicas en una serie de SNP's entre casos y controles no relacionados**, en una muestra de una población dada. Los que más se realizan son los estudios de casos y controles, para evaluar la influencia que se tiene con respecto a la enfermedad (3).

Para cualquier estudio, ya sean GWAS o de casos y controles, es necesario validar los resultados obtenidos por medio de análisis estadísticos adecuados. En la actualidad ya no resulta complicada la realización de estos estudios, existen programas o plataformas de libre acceso, como SNPStats, que permiten analizar los datos proporcionados de manera simultánea y con un cierto nivel de confianza.

4.3.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg

El Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE por su nombre en inglés) consiste en comparar las frecuencias observadas con las esperadas en una población. Este equilibrio está sujeto a tres condiciones: la población de estudio debe ser lo suficientemente grande con

apareamientos al azar, que no se encuentre sometida a cualquier tipo de mutación, selección o migración, y que las frecuencias génicas no varíen de generación en generación.

En el caso del estudio de casos y controles, el HWE en controles evalúa las condiciones de la población en general. En el grupo de casos, el HWE va a depender de que el polimorfismo de estudio influya o no en la enfermedad, si hay una asociación con la enfermedad el equilibrio podría verse alterado.

5. HIPÓTESIS

La presencia de polimorfismos de los genes de NEP, ACE e IDE favorece el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer y su interacción con el Alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E, puede modificar el riesgo genético.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar los polimorfismos de un solo nucleótido en los genes de la neprilisina, la enzima convertidora de angiotensina y la enzima degradadora de insulina, y determinar si la presencia o ausencia del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE modifica el riesgo.

6.2. Objetivos particulares

- Genotipificar polimorfismos de genes involucrados en la degradación de amiloide con el uso de sondas tipo TaqMan por medio de PCR en tiempo real.
- Determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg en un grupo control y un grupo de pacientes con la EA para evaluar la variabilidad genética.
- Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los polimorfismos en los genes mencionados.

- Analizar las frecuencias genotípicas en los grupos de estudio asociándolas a variables como edad y género para verificar si existen diferencias significativas.
- Conocer los patrones de ligamiento entre los loci para la búsqueda de un desequilibrio que pudiera estar asociado a la enfermedad de Alzheimer.
- Asignar el genotipo de ApoE por medio de PCR en tiempo real con el uso de sondas tipo TaqMan.
- Determinar si existe alguna relación entre el genotipo de ApoE y los polimorfismos en el estudio.

7. METODOLOGÍA

7.1. Grupos de estudio

Para este trabajo se establecieron 2 grupos: el primero formado por los pacientes con la EA y un grupo control formado por adultos sin datos clínicos de demencia. En las Tablas 1 y 2 se muestran los criterios de inclusión y exclusión del grupo de pacientes y sujetos control respectivamente.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión del grupo de pacientes con EA.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Nacionalidad mexicana	Nacionalidad extranjera
Diagnóstico presuntivo de EA	Diagnóstico con alguna otra enfermedad neurodegenerativa
Firma de un consentimiento informado	No aceptó el consentimiento
Edad mayor a 60 años	Edad menor de 60 años
Género femenino y masculino	

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión del grupo control.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Nacionalidad mexicana	Nacionalidad extranjera
Sin diagnóstico de alguna demencia	Diagnóstico con alguna demencia o alguna otra enfermedad neurodegenerativa
Firma de un consentimiento informado	No aceptó el consentimiento
Edad mayor a 60 años	Edad menor de 60 años
Género femenino y masculino	

En la Tabla 3 se muestran los datos de edad promedio y género en los grupos de estudio.

Tabla 3. Edad y género de los grupos de estudio.

Grupo	# Individuos Femenino	Masculino	Edad promedio (años)
EA	171	120	51
Control	246	185	61
			76.4 ± 8.4
			73.0 ± 8.3

7.2. Obtención de DNA genómico

Para la obtención del DNA genómico, se realizó una toma de muestra de sangre periférica en tubos Vacutainer® con EDTA como anticoagulante. Posteriormente, se extrajo el DNA genómico mediante el QIAmp DNA Blood Midi kit de QIAGEN (ver Anexo 1). Se cuantificó la concentración de DNA por medio del espectrofotómetro ASP-3700® ACTGene a una longitud de onda de 260 nm y se realizaron diluciones para conseguir una concentración de 10 ng/μL para su posterior genotipificación por PCR en tiempo real. Las diluciones se mantuvieron en congelación a -80°C hasta su uso.

7.2.1. **SNP's analizados**

Un SNP es una variante en el genoma que es transmisible de generación en generación y se presenta en una frecuencia mayor al 1% en la población (60). En este caso, es el más sencillo de los polimorfismos y consiste en el intercambio de una base por otra. Este cambio puede ocurrir en cualquier lugar del genoma cambiando el fenotipo del individuo; cuando la variación se presenta en una región codificante puede conducir a un cambio de aminoácido en la proteína, alterando así su función, si la variación se presenta en una región reguladora puede alterar la transcripción del gen.

Para este proyecto se seleccionaron 12 SNP's involucrados en la degradación de amiloide: 5 localizados en el gen de NEP, 3 en el gen de ACE y 4 en el gen de IDE (Tabla 4). La selección de los **SNP's** se

realizó basándose en los polimorfismos que, en la literatura, han mostrado alguna asociación a la EA en otras poblaciones y están reportados en la base de datos de Alzforum (www.alzgene.org).

Tabla 4. SNP's analizados. Datos tomados de www.ncbi.nlm.nih.gov

SNP	Cromosoma	Localización	Gen	Región	Alelos
					en el cromosoma
rs989692	3	155083576	MME (NEP)	Intrón 1, 5' UTR	C/T
rs3736187	3	155168489	MME (NEP)	Intrón 19	T/C
rs1025192	3	155109998	MME (NEP)	Intrón 4	C/T
rs1816558	3	155125818	MME (NEP)	Intrón 9	A/G
rs2196521	3	155094849	MME (NEP)	Intrón 4	A/G
rs4291	17	63476833	ACE	5', Exón 1	A/T
rs4343	17	63488670	ACE	Exón 16	A/G
rs4362	17	63496400	ACE	Exón 23	C/T
rs3758505	10	92575021	IDE	5' Exón 1	C/A
rs4646953	10	92574198	IDE	5' Exón 1	A/G
rs4646954	10	92574070	IDE	Exón 1	A/G
rs3781239	10	92458040	IDE	Intrón 10	C/G

7.2.2. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real consiste en que, mediante el uso de fluoróforos, se puede monitorear la amplificación del material genético por ciclo. Se utilizó un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems y ensayos con sondas tipo TaqMan® igualmente de Applied Biosystems.

Los ensayos con sondas TaqMan® se componen de oligonucleótidos y de 2 sondas específicas, una para cada variante alélica. Las sondas tipo TaqMan® son oligonucleótidos de DNA que están unidos a fluoróforos **VIC o FAM en su extremo 5'**, mientras que en el extremo 3' tiene un apagador, que sirve para absorber la fluorescencia.

En la reacción, tras la desnaturalización, los oligonucleótidos y la sonda se alinean de forma específica con la hebra molde. La DNA polimerasa **termoestable comienza a agregar dNTP's a la hebra molde a partir del extremo 3' del oligonucleótido** y hasta llegar al oligonucleótido marcado. Posteriormente, por actividad de exonucleasa de la misma DNA polimerasa, escinde el fluoróforo (VIC o FAM) de la sonda que se unió a la secuencia complementaria y lo libera al medio para que sea detectado por el equipo (Figura 11).

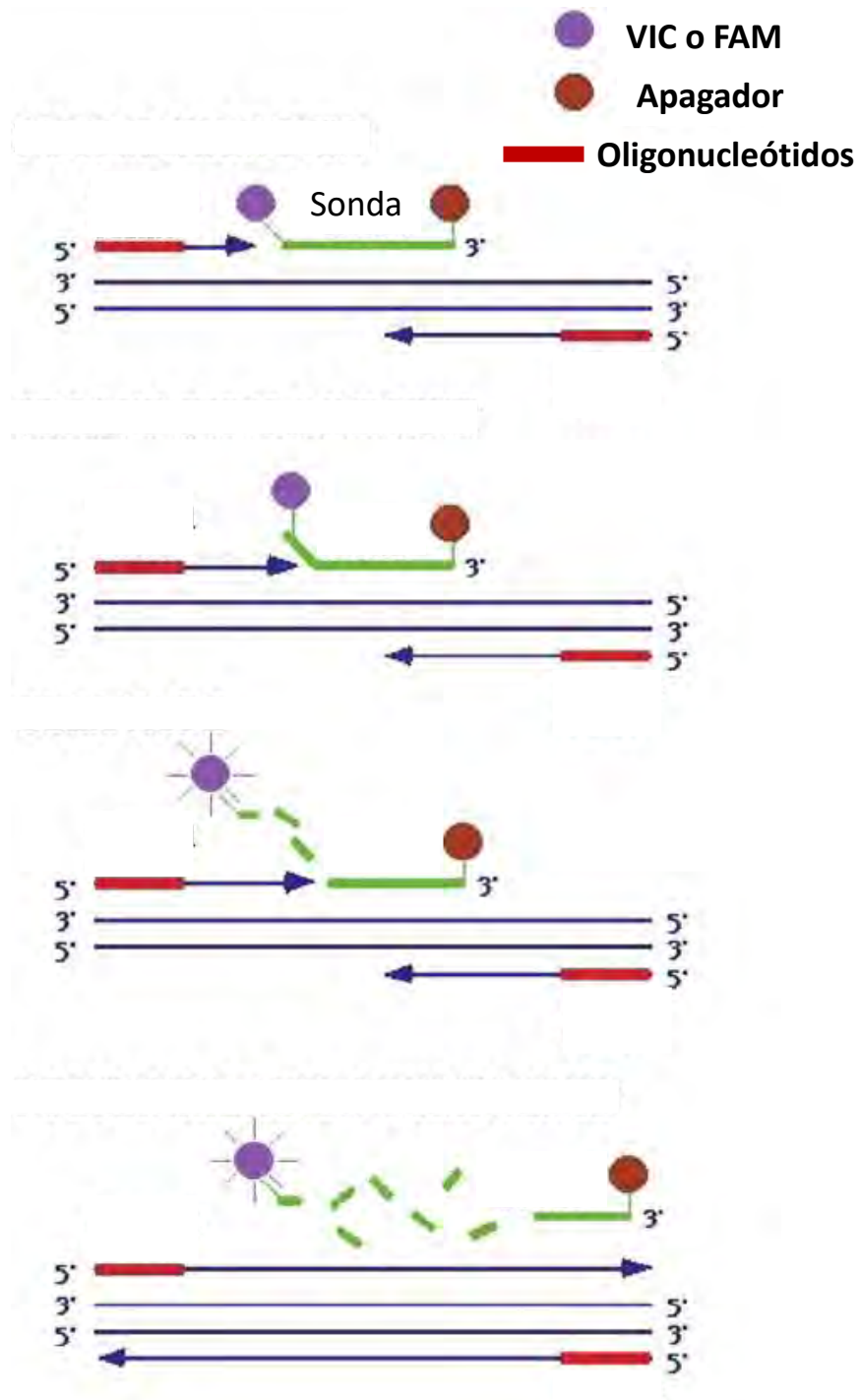


Figura 11. Genotipificación por PCR en tiempo real con sondas TaqMan™. Modificado de Schaad, N. W., et. al. 2003 (61).

Una vez terminada la PCR, el fluoróforo liberado al medio es excitado por una lámpara y emite una señal que es detectada por el equipo y traducida a datos numéricos por medio del software. El software del equipo interpreta las diferentes señales detectadas en una gráfica de dispersión a partir de la cual podemos discriminar el genotipo de cada muestra (Figura 12).

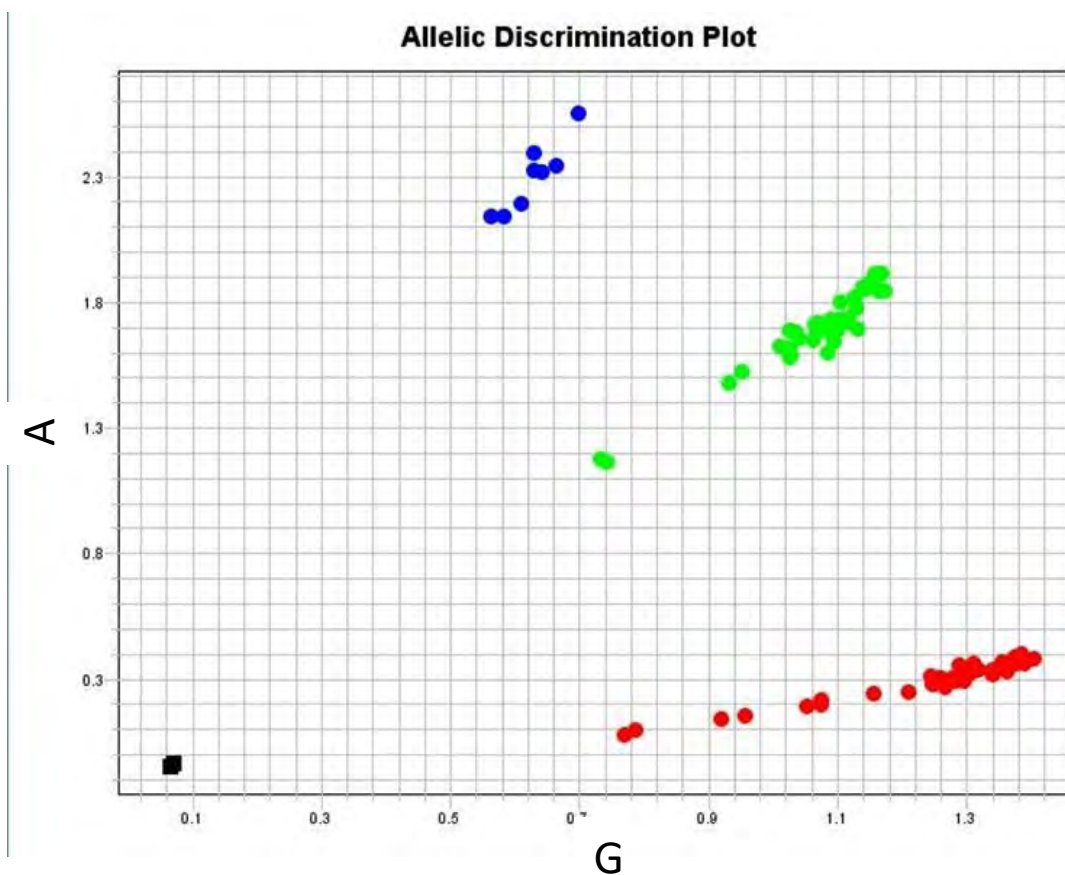


Figura 12. Gráfico de dispersión. Se agrupan las muestras en 3 grupos, en este caso, el azul corresponde a los homocigotos para el alelo A, verde para los heterocigotos y rojo homocigotos para G. El cuadro negro corresponde al control negativo.

Para la reacción de PCR en tiempo real, se emplearon placas de 96 pozos. Cada muestra se corre por duplicado, a la par de un control

negativo el cual no contiene DNA. En la siguiente tabla se especifican los parámetros de la reacción:

Tabla 5. Condiciones de reacción de PCR.

Reactivo	Volumen (μL)
H ₂ O destilada estéril	1.85
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2x) de Applied Biosystems	3.00
Sonda TaqMan™(40x) de Applied BioSystems	0.15
DNA [10 ng/ μL)	1.25
Volumen Total por pozo	6.0

7.3. Análisis estadístico

Con los datos de la genotipificación de los polimorfismos involucrados en la degradación de amiloide, se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas, las frecuencias haplotípicas, el desequilibrio de ligamiento y el HWE para cada uno de los polimorfismos.

Primero se determinó el HWE por medio de GenAEx 6.3 en los 2 grupos de estudio que emplea la prueba de Chi cuadrada para comparar los genotipos esperados con los observados. El valor de p que se consideró significativo fue de 0.05, por lo que un valor menor señala que el resultado es estadísticamente significativo e indica que no fue al azar, si es mayor indica que no hay diferencia ya que sugiere que la respuesta observada fue al azar. En el HWE, se llevó a cabo la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples, con el fin de

darle mayor significancia al estudio al asignar un nuevo valor de p . La corrección de Bonferroni se determina dividiendo 0.05 entre el número de polimorfismos analizados.

Mediante el uso de SNPStats (Institut Català d'Oncologia), se obtuvieron los datos de las frecuencias alélicas y genotípicas de cada uno de los polimorfismos, así como la correlación con otros factores como género y edad. Para determinar si las frecuencias alélicas de algún gen representaban un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad, se realizaron comparaciones por medio de cuadros de 2x2 **en Epi Info™ versión 7.2.2.1(Center for Disease Control and Prevention)** tomando en cuenta los valores de p , la razón de momios (OR) e intervalos de confianza al 95% para la comparación. La determinación de dichos parámetros se realizó a través de una prueba de Chi cuadrada y la prueba de Fisher.

Las frecuencias genotípicas se compararon de acuerdo con los datos proporcionados por SNPStats en los diferentes modelos de herencia tomando en consideración los valores de p , OR e intervalos de confianza al 95%.

Posteriormente, se determinaron las frecuencias haplotípicas y combinaciones multiloci por medio de Arlequin versión 3.11. Se descartaron aquellos polimorfismos que estuvieran fuera del HWE en el grupo control. Con las frecuencias obtenidas se realizó una comparación entre grupos de estudio por medio de cuadros 2x2 en Epi Info™ **para determinar si existían diferencias significativas.**

Posteriormente, se evaluó el desequilibrio de ligamiento por medio de Haploview versión 4.1.

7.4. Asignación de genotipos de ApoE

Se utilizaron 2 sondas tipo TaqMan® para asignar el genotipo por medio de PCR en tiempo real (Tabla 6).

Tabla 6. SNP's utilizados para designar el genotipo de ApoE.

SNP	Cromosoma	Localización en el cromosoma	Región	Alelos
rs429358	19	44908684	Exón 4	C/T
rs7412	19	44908822	Exón 4	C/T

Con los datos obtenidos por PCR en tiempo real, se asignó el genotipo a cada muestra de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 7. Genotipos y cambios de aminoácidos asociados al estatus alélico de ApoE (62).

E2/E3/E4	112 (rs429358)		158 (rs7412)	
	Genotipo	Aminoácido	Genotipo	Aminoácido
E2/E2	TT	cys/cys	TT	cys/cys
E2/E3	TT	cys/cys	TC	cys/arg
E2/E4	TC	cys/arg	TC	cys/arg
E3/E3	TT	cys/cys	CC	arg/arg
E3/E4	TC	cys/arg	CC	arg/arg
E4/E4	CC	arg/arg	CC	arg/arg

Posteriormente, se determinaron los porcentajes correspondientes a cada genotipo entre los grupos y así comparar en busca de diferencias significativas entre los grupos. La comparación se realizó con Epi **Info™**.

Para evaluar si existía alguna relación entre el genotipo de ApoE y algún polimorfismo de los genes de NEP, ACE e IDE, se realizó un análisis por medio de SNPStats comparando la presencia o ausencia **del alelo $\epsilon 4$ de ApoE con los diferentes genotipos en los 2 grupos de estudio.**

8. RESULTADOS

8.1. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Por medio de GenAEx se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos seleccionados en el presente estudio. Los valores reportados en la Tabla 8 tienen en consideración la corrección de Bonferroni, por lo tanto, son significativos aquellos valores de $p < 0.004$.

En la Tabla 8 se puede observar que, en ambos grupos de estudio, el valor de p en el polimorfismo rs2196521 del gen de NEP y el polimorfismo rs3781239 del gen de IDE indica que no se encuentran en el equilibrio.

Tabla 8. Equilibrio de Hardy-Weinberg. Valores de p con la corrección de Bonferroni para el grupo Control y el grupo de EA, resaltan en rojo los valores que no se encuentran en el equilibrio.

Gen	SNP	Control	EA
		p	p
NEP	rs989692	0.984	0.159
	rs3736187	0.344	0.637
	rs1025192	0.068	0.455
	rs1816558	0.407	0.022
	rs2196521	2.151 E-09	5.151 E-14
ACE	rs4291	0.683	0.446
	rs4343	0.574	0.493
	rs4362	0.011	0.619
IDE	rs3758505	0.064	0.740
	rs4646953	0.419	0.487
	rs4646954	0.185	0.678
	rs3781239	7.087 E-19	1.011 E-16

De acuerdo con el HWE, cuando p es menor a 0.004 se asume que al menos una de las siguientes condiciones están presentes:

- Existe selección natural, posiblemente relacionado con la longevidad del/los individuo(s).
- Apareamiento no aleatorio, por ejemplo, la presencia de consanguinidad (3).

Para los análisis posteriores se descartaron los polimorfismos que no cumplen con el HWE.

8.2. Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas se obtuvieron por medio de SNPStats. Por medio de Epi Info™ se determinó si alguno de los alelos pudiera ser considerado de riesgo. Se consideró que un valor de p menor o igual a 0.05 indica diferencia entre los 2 grupos de estudio y posteriormente, el valor de OR determina el incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad. El intervalo de confianza al 95% (95%CI) indica los límites superior e inferior para encontrar el valor real (en este caso de OR) con un 95% de probabilidad de acierto.

Para los polimorfismos de NEP y ACE no se obtuvieron valores de $p < 0.05$ (Ver Anexo 2). Para el polimorfismo rs3758505 del gen de IDE, la presencia del alelo C aumenta aproximadamente 2 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad ($p=0.05$, OR=1.80) (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación entre frecuencias alélicas de IDE.

Gen	SNP	Alelo	EA	Control	p	OR	95% CI
IDE	rs3758505	C	0.4	0.27	0.05	1.80	0.99-3.27
		A	0.6	0.73			0.55
	rs4646953	A	0.89	0.91	0.64	0.80	0.32-2.02
		G	0.11	0.09			1.25
	rs4646954	A	0.27	0.34	0.28	0.72	0.39-1.31
		G	0.73	0.66			1.39

8.3. Frecuencias genotípicas

Las frecuencias genotípicas de los 2 grupos de estudio se obtuvieron por medio de SNPStats. Se realizó la comparación entre las frecuencias genotípicas para determinar si la presencia de un genotipo en específico incrementa el riesgo o no de desarrollar la enfermedad. Para el gen de NEP, se observó que el genotipo heterocigoto del polimorfismo rs1025192 presenta un valor de $p=0.043$ y $OR=1.51$, esto indica que la presencia de este genotipo aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad en aproximadamente un 50% (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación de frecuencias genotípicas para el gen de NEP. Valores de p y OR de acuerdo con el modelo sobredominante.

Gen	SNP	Genotipo	EA	Control	p	OR (95% CI)
NEP	rs989692	C/C-T/T	0.48	0.54	0.44	1.00
		C/T	0.52	0.46		0.85 (0.57-1.27)
	rs3736187	T/T-C/C	0.89	0.89	0.95	1.00
		T/C	0.11	0.11		1.02 (0.54-1.93)
	rs1025192	T/T-C/C	0.57	0.48	0.043	1.00
		C/T	0.43	0.52		1.51 (1.01-2.26)
	rs1816558	G/G-A/A	0.59	0.54	0.12	1.00
		A/G	0.41	0.46		1.38 (0.92-2.07)

Para los genes de ACE e IDE no se encontraron genotipos con valores significativos de p y OR (Ver Anexo 3).

8.4. Combinaciones multiloci y haplotipos

Para determinar las frecuencias haplotípicas se utilizó el programa Arlequin versión 3.11.

Se obtuvieron 163 combinaciones multiloci (Ver Anexo 4) de las cuales, solo 1 tuvo un valor de $p=0.003$ lo que puede indicar que la presencia de esta combinación incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad. Cabe resaltar que la presencia de esta combinación en el grupo de EA es mayor en comparación con el grupo control (Tabla 11).

Tabla 11. Combinación multiloci.

NEP				ACE			IDE		%	%	p	
rs989692	rs3736187	rs1025192	rs1816558	rs4291	rs4343	rs4362	rs3758505	rs4646953	rs4646954	Casos	Control	
C	T	T	A	A	A	C	C	A	G	9.0	0.1	0.003

Al comparar las frecuencias haplotípicas, para los polimorfismos de NEP y ACE no se obtuvo algún haplotipo con valores de $p < 0.05$ (Ver Anexo 5). Para el gen de IDE, el haplotipo CAG presentó un valor de $p=0.0006$ y OR=16.12 lo que conferiría un incremento de hasta 16 veces en el riesgo de desarrollar la enfermedad (Tabla 12).

Tabla 12. Haplotipos de IDE con sus respectivas frecuencias y valores de *p*.

Gen	Haplotipo			% Frec	% Frec	<i>p</i>	OR
	rs3758505	rs4646953	rs4646954	EA	Control		
IDE	C	A	G	14	1	0.0006	16.12
	A	A	A	6	7	1.00	0.85
	A	A	G	45	57	0.12	0.62
	A	G	A	0	1	1	*
	A	G	G	9	7	0.79	1.31
	C	A	A	22	25	0.74	0.85
	C	G	G	4	1	0.37	4.12

*No se puede definir debido a las bajas frecuencias

8.5. Desequilibrio de ligamiento

En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos al comparar loci de cada gen por medio de Haploview. Se considera que 2 polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento cuando el valor de **D'** es cercano o igual a 1. En el gen de NEP no se observaron resultados que indicaran un desequilibrio. En el gen de IDE, entre los polimorfismos **rs4646954** y **rs4646953** se observa que **D'=0.846**, sin embargo, su valor de correlación (r^2) es muy bajo. En ACE se puede observar como los polimorfismos rs4343 y rs4362 se encuentran en desequilibrio de ligamiento (**D'=0.912**).

Tabla 13. Valores de D' y r^2 para los genes de NEP, ACE e IDE.

Gen	Locus 1	Locus 2	D'	r^2
NEP	rs989692	rs1025192	0.075	0.005
	rs989692	rs1816558	0.05	0.001
	rs989692	rs3736187	0.357	0.013
	rs1025192	rs1816558	0.319	0.065
	rs1025192	rs3736187	0.289	0.003
	rs1816558	rs3736187	0.013	0
ACE	rs4291	rs4343	0.806	0.436
	rs4291	rs4362	0.801	0.386
	rs4343	rs4362	0.912	0.745
IDE	rs4646954	rs4646953	0.846	0.039
	rs4646954	rs3758505	0.639	0.389
	rs4646953	rs3758505	0.461	0.012

Este desequilibrio en el gen de ACE se puede observar en la Figura 10 indicando que ambos loci se heredan de manera conjunta y no al azar y que tal vez, algún gen o polimorfismo que se encuentra involucrado con la enfermedad se encuentra en ese bloque de 7 kb.

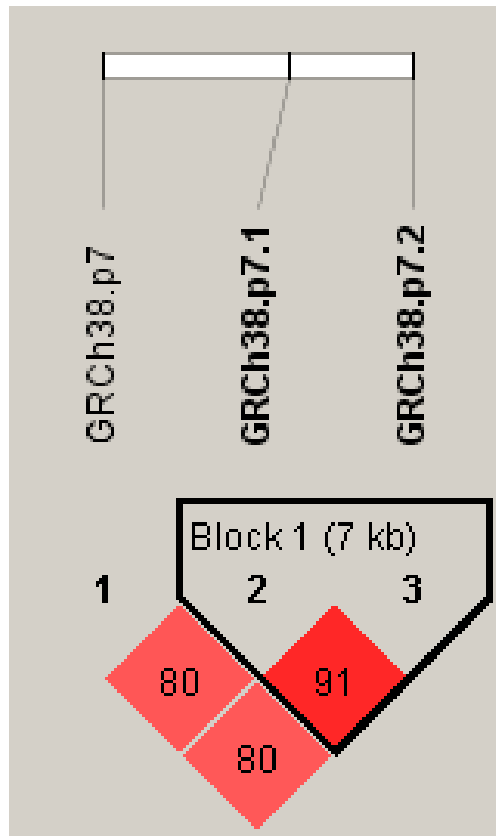


Figura 13. Esquema de desequilibrio para el gen de ACE, los valores presentados representan D' . GRCh38.p7 = rs4291, GRCh38.p7.1 = rs4343, GRCh38.p7.2 = rs4362.

8.6. Genotipos de ApoE

En la Tabla 14 se observan las frecuencias de los genotipos de ApoE en los 2 grupos de estudio; se puede observar que el genotipo E3/E4 es significativamente mayor en el grupo de EA ($p= 0.004$). A pesar de que el genotipo E4/E4 también presenta un mayor porcentaje de pacientes, la p calculada no resulta significativa.

Tabla 14. Comparación entre los grupos de estudio. El valor de p se obtuvo a partir de un test exacto de Fisher a 2 colas.

Genotipos de ApoE	% EA	% CON	p
E2/E2	0.0	0.8	1
E2/E3	5.8	15.0	0.06
E2/E4	0.0	1.2	1
E3/E3	56.7	67.9	0.14
E3/E4	32.2	14.2	0.004
E4/E4	5.3	0.8	0.21

En la Figura 11 se observa la distribución de los genotipos de ApoE en los 2 grupos de estudio. Se observa claramente como en el genotipo E3/E4 hay un mayor porcentaje de pacientes en comparación con los sujetos control.

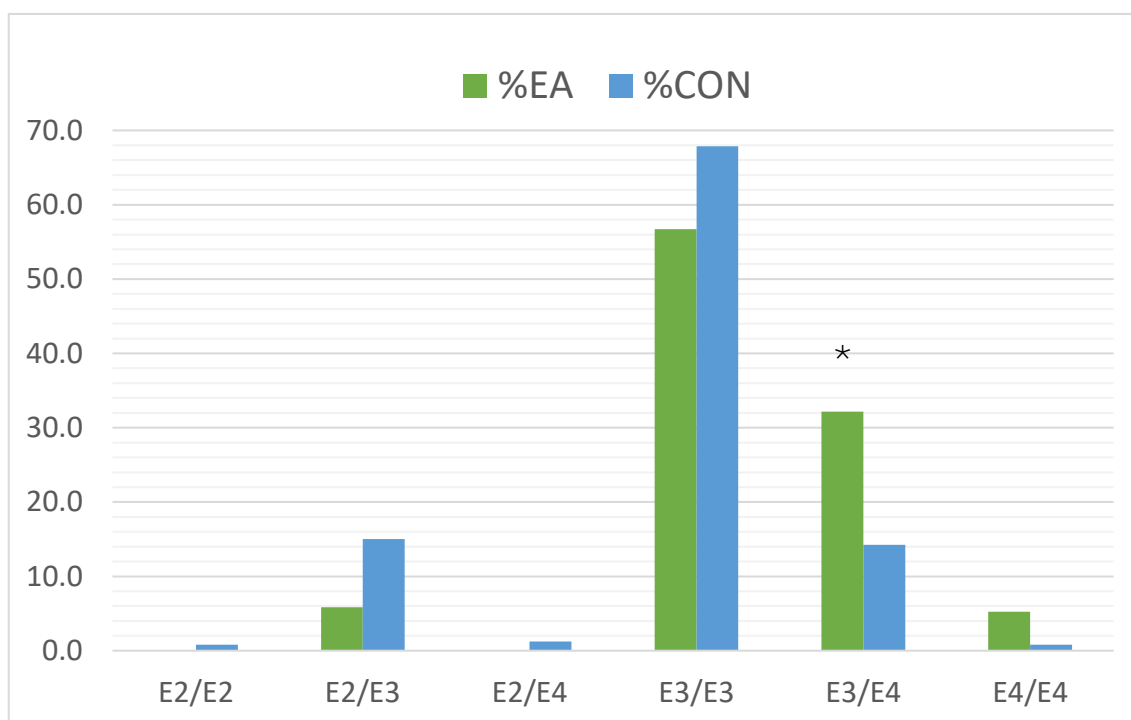


Figura 14. Distribución de los genotipos de ApoE en los grupos de estudio. *: en este genotipo se observa un mayor porcentaje de pacientes en comparación con los sujetos control.

Posteriormente se realizó un análisis en SNPStats en busca de una relación entre el genotipo de ApoE y los polimorfismos de los genes de NEP, ACE e IDE.

En los polimorfismos de los genes de NEP y ACE no se encontraron valores de OR que indicaran alguna relación entre el polimorfismo y el genotipo de ApoE ($OR \leq 1.00$). Para el polimorfismo rs4646954 del gen **de IDE se observó que la presencia del alelo $\epsilon 4$ en combinación con el genotipo heterocigoto con un valor de $OR=3.27$ aumenta aproximadamente 3 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad (Tabla 15).**

Tabla 15. Análisis de la interacción entre la presencia del alelo $\epsilon 4$ de ApoE y el polimorfismo rs4646954 de IDE para $n=417$.

ApoE	Genotipo	#EA	#Controles	OR (95% CI)
Ausencia de alelo $\epsilon 4$	G/G	52	97	1.00
	A/G	48	78	0.91 (0.55-1.50)
	A/A	7	31	2.67 (1.08-6.57)
Presencia de alelo $\epsilon 4$	G/G	39	15	1.00
	A/G	18	23	3.27 (1.36-7.84)
	A/A	7	2	0.63 (0.12-3.45)

* $p=0.0028$

9. DISCUSIÓN

La Enfermedad de Alzheimer es una patología que presenta 2 tipos de lesiones en el cerebro: las MNF formadas por agregados intracelulares de la proteína Tau en estado hiperfosforilado y las PN que son agregados extracelulares del péptido amiloide beta en estado fibrilar. Su presencia es considerada como el diagnóstico definitivo para la enfermedad. Actualmente, no existe un diagnóstico temprano de la EA, sin embargo, se conoce la participación de genes relacionados a la predisposición por la enfermedad.

Algunos de los genes identificados intervienen con la degradación del péptido amiloide beta como lo son la NEP, la ACE y la IDE. También se conoce la participación del gen de la Apolipoproteína E en la cual, **la presencia del alelo $\epsilon 4$ es considerado el mayor factor de riesgo genético.** Estos genes han sido identificados gracias a estudios de asociación genética. Los estudios de asociación genética permiten evaluar la relación estadística entre un fenotipo determinado y las variables genéticas en la población.

La mayoría de los estudios de asociación a la enfermedad hasta ahora reportados han sido realizados en poblaciones caucásicas, pero no en la población mexicana (www.alzgene.org). Con base en esto, se planteó el presente estudio con el propósito de analizar polimorfismos de 3 diferentes genes asociados a la degradación del péptido amiloide beta en relación con la presencia o ausencia del alelo $\epsilon 4$ de ApoE en la población mexicana. Para el presente estudio se evaluaron 5 SNP's del

gen de NEP, 3 SNP's del gen de ACE y 3 SNP's del gen de IDE, así como el genotipo de ApoE en una muestra de 171 pacientes con diagnóstico presuntivo de la EA y 246 sujetos control.

Lo primero que se determinó fue el HWE para evaluar las condiciones generales de los grupos de estudio. El polimorfismo rs2196521 del gen de NEP y el polimorfismo rs3781239 del gen de IDE no se encontraban en el HWE en ambos grupos de estudio por lo que se decidió excluirlos de los análisis posteriores. Si un polimorfismo no se encuentra en HWE en el grupo control, puede proporcionar falsos positivos. Si un polimorfismo no se encuentra en equilibrio en el grupo de pacientes, esto podría sugerir que está relacionado a la enfermedad.

Para el gen de NEP, solo un polimorfismo mostró resultados significativos en los diferentes análisis realizados. En el polimorfismo rs1025192, el genotipo heterocigoto C/T indicó que aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad ($p=0.043$, $OR=1.51$). Estos resultados discrepan de estudios realizados previamente en una población finlandesa. En el estudio realizado por Helisalmi, et. al., el genotipo homocigoto T/T del polimorfismo rs989692 y el genotipo homocigoto A/A del polimorfismo rs3736187 presentaron resultados significativos tras ajustarse con variables como edad y género. Estos resultados presentados se obtuvieron a partir de un tamaño de muestra de casi el doble que la nuestra, por lo que es probable que se vea involucrado el tamaño de la muestra (390 EA, 480 control contra 171 EA, 246 control) (63).

En el gen de ACE, un estudio realizado por Edwards, et. al. demostró que el polimorfismo rs4343 está fuertemente involucrado en la EA en los Estados Unidos. El alelo A está involucrado en el desarrollo de la patología y es parte de haplotipos de riesgo en ese estudio (64). En nuestros resultados no se encontró algún alelo de los polimorfismos de ACE que sugiriera un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad, sin embargo, si se observa que el alelo A del polimorfismo rs4343 se encuentra en la combinación multiloci que representa un riesgo. Es posible que las diferencias se deban al tamaño de la muestra (casi el doble de individuos en ambos grupos).

En nuestro estudio se presenta un desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs4343 y rs4362 del gen de ACE. El desequilibrio de ligamiento indica la posibilidad de que durante la división celular 2 o más loci se hereden de manera conjunta o no. Se dice que 2 loci se encuentran en desequilibrio de ligamiento si se heredan de manera conjunta, es decir, si no hubo recombinación y ambos loci se encuentran lo suficientemente cerca entre sí. Este desequilibrio discrepa del estudio realizado por Meng et. al. en la población israelí; en este estudio se muestran 3 diagramas de bloques de los cuales ninguno resultó concluyente debido a los bajos valores de r^2 ($r^2=0.22$) (65). Sin embargo, nuestro desequilibrio concuerda con los resultados de Kehoe et. al. en un estudio poblacional de 3 diferentes países europeos. Kehoe et. al. encontraron que existe un desequilibrio presente entre los polimorfismos rs4343 y rs4362 ($r^2=0.960$) en las

poblaciones sueca y escocesa. En ese estudio también se obtuvo un desequilibrio entre el rs4343 y un polimorfismo de inserción/delección (I/D) (66).

En nuestro estudio, para el gen de ACE no se encontraron alelos, genotipos o haplotipos de riesgo, sin embargo, en el estudio de Meng et. al. los polimorfismos rs4343 y rs4351 muestran alelos de riesgo y señalan que posiblemente existe algún haplotipo asociado a la EA en la región que comprende a dichos polimorfismos junto con un polimorfismo de inserción/delección. En ese mismo estudio de Meng et. al. tampoco se mostró asociación a la enfermedad por parte del polimorfismo rs4291. Los resultados que se observan en este estudio pueden deberse al tamaño en su grupo de estudio (65). En el estudio de Kehoe et. al., el polimorfismo rs4291 presenta una fuerte relación con la EA tras analizar los genotipos (OR= 1.64), indicando a la vez, que el alelo A estaba presente en el haplotipo de mayor porcentaje en el grupo de casos en las poblaciones sueca, escocesa e inglesa (66).

Para el gen de IDE, el alelo C del polimorfismo rs3758505 presenta un incremento en el riesgo de hasta 2 veces ($p=0.05$, OR=1.80). Este mismo alelo está presente en el haplotipo CAG que encontramos en nuestro estudio. Esta combinación concuerda parcialmente con lo sustentado en el trabajo de tesis de Elimar Torres Ossorio; en su estudio se encontraron 3 haplotipos de riesgo en el gen de IDE, entre ellos, el haplotipo CAGC que se presentó en el 24% del grupo de pacientes ($p=1.896E-07$) (7). El haplotipo CAG en nuestro estudio se

observa más frecuente en los pacientes y aumenta hasta 16 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad ($p=0.0006$, $OR=16.12$).

En un estudio realizado en Estados Unidos por Edland et. al., se observó que el haplotipo GTT, que corresponde a los polimorfismos rs3758505, rs4646954 y rs4646958 respectivamente, tiene carácter protector a la enfermedad con relación a la ausencia del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE. Esta asociación se observa en mayor porcentaje en el grupo control (67).

La distribución de los genotipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ y $\epsilon 4/\epsilon 4$ de ApoE están presentes en mayor proporción en el grupo de pacientes que en los sujetos control. Estos resultados concuerdan con diversos estudios en los que el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ está presente en mayor proporción en los pacientes en comparación con el genotipo $\epsilon 4/\epsilon 4$ (68-70).

En nuestro estudio evaluamos la relación entre el genotipo de ApoE y los genotipos de polimorfismos de los genes de NEP, ACE e IDE. Los polimorfismos de los genes de NEP y ACE no mostraron resultados significativos. Con respecto al gen de IDE, el polimorfismo rs4646954 mostró que el genotipo heterocigoto A/G, bajo la presencia del alelo $\epsilon 4$, **incrementa 3** veces el riesgo de desarrollar la enfermedad ($OR=3.27$). Estos resultados discrepan de lo reportado por Bian et. al. y posteriormente por Zuo y Jia en la población de Han en China. En el estudio de Bian et. al., reportaron que tanto las frecuencias alélicas como genotípicas del polimorfismo rs4646953 del gen de IDE, presentaron diferencias significativas entre el grupo de casos y el grupo

de sujetos control que presentaban el alelo $\epsilon 4$ de ApoE ($p < 0.05$) (71).

En el estudio de Zuo y Jia, evaluaron los polimorfismos rs3758505, rs4646953 y el rs4646954 de IDE de los cuales, las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs3758505 y rs4646954 mostraron resultados significativos de forma independiente del genotipo de ApoE (72).

Para los resultados presentados, cabe resaltar la necesidad de una corrección de ancestría para validar la información obtenida.

De acuerdo con la hipótesis, polimorfismos de los 3 genes de estudio favorecerían el desarrollo de la EA. Se observó que los polimorfismos rs3758505 del gen de IDE, rs1025192 del gen de NEP favorecen el desarrollo de la EA. También se observó que un haplotipo del gen de IDE modifica el riesgo, además de un desequilibrio entre los polimorfismos rs4343 y rs4362 del gen de ACE.

La hipótesis planteada indicaba que la interacción **entre el alelo $\epsilon 4$ de ApoE** y los polimorfismos estudiados, modificarían el riesgo de desarrollar la EA. De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede decir que la asociación entre **el alelo $\epsilon 4$** de la ApoE y el polimorfismo rs4646953 del gen de IDE confirma la hipótesis. Esta asociación resulta en un incremento en el riesgo de desarrollar la EA en la población mexicana.

10. CONCLUSIONES

En este proyecto se identificó que el alelo C del polimorfismo rs3758505 del gen de IDE y el genotipo heterocigoto del polimorfismo rs1025192 del gen de NEP incrementan el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer ($p=0.05$, OR=1.80; $p=0.043$, OR=1.51 respectivamente).

De las 163 combinaciones multiloci que se obtuvieron, sólo una se presentó en mayor proporción en pacientes con un valor de $p=0.003$ incrementando el riesgo de desarrollar la EA. El haplotipo CAG del gen de IDE igualmente se presenta en mayor proporción en los pacientes confiriendo un incremento de hasta 16 veces en desarrollar la enfermedad en la población mexicana.

La presencia del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE en combinación con el genotipo heterocigoto A/G del polimorfismo rs4646954 del gen de IDE incrementan el riesgo de desarrollar la enfermedad hasta 3 veces en la población.

11. REFERENCIAS

1. WHO. Demencia 2017 [cited 2018]. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
2. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. World Alzheimer Report 2016. Improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future. *Alzheimer's Disease International*, 2016: 140.
3. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. [Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gac Sanit*. 2005;19(4): 333-341.
4. 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.
5. Seitz DP, Chan CC, Newton HT, Gill SS, Herrmann N, Smailagic N, et al. Mini-Cog for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias within a primary care setting. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2: CD011415.
6. Morris JC. Clinical dementia rating: a reliable and valid diagnostic and staging measure for dementia of the Alzheimer type. *Int Psychogeriatr*. 1997;9 Suppl 1: 173-6; discussion 7-8.
7. Torres-Ossorio ME. Identificación de Marcadores Genéticos Asociados con la Eliminación de Amiloide-beta en Pacientes Mexicanos con enfermedad de Alzheimer [Tesis de Licenciatura]. México: UNAM; 2016: 78.
8. NIA-NIH. Alzheimer's Disease Fact Sheet. 2016 [cited 2018]. Available from: <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>.
9. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a006189.
10. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4): 239-259.
11. Meraz-Ríos MA, Lira-De León KI, Campos-Peña V, De Anda-Hernández MA, Mena-López R. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2010;112(6): 1353-1367.
12. Campos-Peña V, Gómez R, Meraz-Ríos MA. Genetics of Alzheimer's Disease. In: Heinbockel T, ed. *Neurochemistry*. InTech; 2014: 317-354.

13. Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci*. 1993; 13(4):1676-1687.
14. Joachim CL, Morris JH, Selkoe DJ. Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1989; 135(2):309-319.
15. Di Carlo M. Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J*. 2010; 39(6):877-888.
16. Masters CL, Selkoe DJ. Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(6):a006262.
17. Wang DS, Dickson DW, Malter JS. beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol*. 2006; 2006(3):58406.
18. **Saido T, Leissring MA. Proteolytic degradation of amyloid β -protein.** *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(6):a006379.
19. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011; 4: 3.
20. NCBI. MME membrane metalloendopeptidase [Homo sapiens (human)]. 2018 [cited 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4311>.
21. Marr RA, Hafez DM. Amyloid-beta and Alzheimer's disease: the role of neprilysin-2 in amyloid-beta clearance. *Front Aging Neurosci*. 2014; 6:187.
22. Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *BioEssays*. 2001; 23(3): 261-269.
23. Nalivaeva NN, Belyaev ND, Zhuravin IA, Turner AJ. The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? *Int J Alzheimers Dis*. 2012; 2012: 383796.
24. Caccamo A, Oddo S, Sugarman MC, Akbari Y, LaFerla FM. Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol Aging*. 2005; 26(5): 645-654.
25. Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci Lett*. 2001; 297(2): 97-100.
26. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, et al. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents

plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron*. 2003; 40(6): 1087-1093.

27. NCBI. ACE angiotensin I converting enzyme [Homo sapiens (human)]. 2018 [cited 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1636>.

28. Larmuth KM, Masuyer G, Douglas RG, Schwager SL, Acharya KR, Sturrock ED. Kinetic and structural characterization of amyloid- β peptide hydrolysis by human angiotensin-1-converting enzyme. *FEBS J*. 2016; 283(6): 1060-1076.

29. UniProt. UniProtKB-P12821 [cited 2018]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P12821>.

30. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2000; 275(43): 33238-33243.

31. Hooper NM. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett*. 1994; 354(1): 1-6.

32. Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, Schembri JM, Lew RA, Smith AI, et al. Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2. *Gut*. 2005; 54(12): 1790-1796.

33. Nalivaeva NN, Beckett C, Belyaev ND, Turner AJ. Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J Neurochem*. 2012; 120 Suppl 1: 167-185.

34. Torika N, Asraf K, Roasso E, Danon A, Fleisher-Berkovich S. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors Ameliorate Brain Inflammation Associated with Microglial Activation: Possible Implications for Alzheimer's Disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2016; 11(4): 774-785.

35. AbdAlla S, Langer A, Fu X, Quitterer U. ACE inhibition with captopril retards the development of signs of neurodegeneration in an animal model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(8): 16917-16942.

36. NCBI. IDE insulin degrading enzyme [Homo sapiens (human)]. 2018 [cited 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3416>.

37. Hulse RE, Ralat LA, Wei-Jen T. Structure, function, and regulation of insulin-degrading enzyme. *Vitam Horm*. 2009; 80: 635-648.

38. Chesneau V, Vekrellis K, Rosner MR, Selkoe DJ. Purified recombinant insulin-degrading enzyme degrades amyloid beta-protein

but does not promote its oligomerization. *Biochem J.* 2000; 351 Pt 2: 509-516.

39. UniProt. UniProtKB-P14735 [cited 2018]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P14735>.

40. Becker AB, Roth RA. An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992; 89(9): 3835-3839.

41. Neant-Fery M, Garcia-Ordoñez RD, Logan TP, Selkoe DJ, Li L, Reinstatler L, et al. Molecular basis for the thiol sensitivity of insulin-degrading enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(28): 9582-9587.

42. Glebov K, Schütze S, Walter J. Functional relevance of a novel SlyX motif in non-conventional secretion of insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem.* 2011; 286(26): 22711-22715.

43. Bulloj A, Leal MC, Xu H, Castaño EM, Morelli L. Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: a secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease. *J Alzheimers Dis.* 2010; 19(1): 79-95.

44. Stargardt A, Gillis J, Kamphuis W, Wiemhoefer A, Kooijman L, Raspe M, et al. Reduced amyloid-beta degradation in early Alzheimer's disease but not in the APP^{swe}PS1^{dE9} and 3xTg-AD mouse models. *Aging cell.* 2013; 12(3): 499-507.

45. Cruts M, Hendriks L, Van Broeckhoven C. The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology. *Hum Mol Genet.* 1996; 5 Spec No: 1449-1455.

46. Krishnaswamy S, Verdile G, Groth D, Kanyenda L, Martins RN. The structure and function of Alzheimer's gamma secretase enzyme complex. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009; 46(5-6): 282-301.

47. ALZFORUM. PSEN1. 2018 [cited 2018]. Available from: <https://www.alzforum.org/mutations/search?genes%5B%5D=493&diseases%5B%5D=145&keywords-entry=&keywords=#results>.

48. ALZFORUM. PSEN2. 2018 [cited 2018]. Available from: <https://www.alzforum.org/mutations/search?genes%5B%5D=494&diseases%5B%5D=145&keywords-entry=&keywords=#results>.

49. ALZFORUM. APP. 2018 [cited 2018]. Available from: <https://www.alzforum.org/mutations/search?genes%5B%5D=348&diseases%5B%5D=145&keywords-entry=&keywords=#results>.

50. Barber IS, García-Cárdenas JM, Sakdapanichkul C, Deacon C, Zapata Erazo G, Guerreiro R, et al. Screening exons 16 and 17 of the amyloid precursor protein gene in sporadic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2016; 39: 220.e1-7.

51. Dominiczak MH, Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem.* 2011;48(Pt 6):498-515.
52. Genaro Gabriel Ortiz FPP-M, Erika D. González-, Renovato LF, Miguel A. Macías-Islas, Mario Mireles-, Ramírez LJF-A, Angélica Sánchez-López, Dhea G., Nuño-Penilla IEV-B, Juan P. Sánchez-Luna, Rosa aACdl. Genetic, Biochemical and Histopathological Aspects of Familiar Alzheimer's Disease. In: Zerr PI, ed. *Alzheimer's Disease - Challenges for the Future.* InTech; 2015:297-324.
53. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Jr., et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994;7(2):180-184.
54. Spinney L. Alzheimer's disease: The forgetting gene. *Nature.* 2014;510(7503):26-28.
55. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(2):106-118.
56. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15056.
57. **Michaelson DM. APOE ϵ 4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease.** *Alzheimers Dement.* 2014;10(6):861-868.
58. Franco-Bocanegra DK. Evaluación de polimorfismos en genes relacionados con la inflamación en pacientes mexicanos con Enfermedad de Alzheimer [Tesis de Maestría]. México: UNAM; 2014:89.
59. Bertram L, Tanzi RE. Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2009;18(R2):R137-145.
60. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998;280(5366):1077-1082.
61. Schaad NW, Frederick RD, Shaw J, Schneider WL, Hickson R, Petrillo MD, et al. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu Rev Phytopathol.* 2003;41:305-324.
62. Belbin O, Dunn JL, Ling Y, Morgan L, Chappell S, Beaumont H, et al. Regulatory region single nucleotide polymorphisms of the apolipoprotein E gene and the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2007;16(18):2199-2208.

63. Helisalmi S, Hiltunen M, Vepsalainen S, Iivonen S, Mannermaa A, Lehtovirta M, et al. Polymorphisms in neprilysin gene affect the risk of Alzheimer's disease in Finnish patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75(12): 1746-1748.
64. Edwards TL, Pericak-Vance M, Gilbert JR, Haines JL, Martin ER, Ritchie MD. An association analysis of Alzheimer disease candidate genes detects an ancestral risk haplotype clade in ACE and putative multilocus association between ACE, A2M, and LRRTM3. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009; 150B(5): 721-735.
65. Meng Y, Baldwin CT, Bowirrat A, Waraska K, Inzelberg R, Friedland RP, 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.
66. Kehoe PG, Katzov H, Feuk L, Bennet AM, Johansson B, Wiman B, et al. Haplotypes extending across ACE are associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2003; 12(8): 859-867.
67. Edland SD, Wavrant-De Vriese F, Compton D, Smith GE, Ivnik R, Boeve BF, et al. Insulin degrading enzyme (IDE) genetic variants and risk of Alzheimer's disease: evidence of effect modification by apolipoprotein E (APOE). *Neurosci Lett*. 2003; 345(1): 21-24.
68. Liu M, Bian C, Zhang J, Wen F. Apolipoprotein E gene polymorphism and Alzheimer's disease in Chinese population: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2014; 4: 4383.
69. Zubenko GS, Stiffler S, Stabler S, Kopp U, Hughes HB, Cohen BM, et al. Association of the apolipoprotein E epsilon 4 allele with clinical subtypes of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Am J Med Genet*. 1994; 54(3): 199-205.
70. Han MR, Schellenberg GD, Wang LS, Alzheimer's Disease Neuroimaging I. Genome-wide association reveals genetic effects on human Abeta42 and tau protein levels in cerebrospinal fluids: a case control study. *BMC Neurol*. 2010; 10: 90.
71. Bian L, Yang JD, Guo TW, Sun Y, Duan SW, Chen WY, et al. Insulin-degrading enzyme and Alzheimer disease: a genetic association study in the Han Chinese. *Neurology*. 2004; 63(2): 241-245.
72. Zuo X, Jia J. Promoter polymorphisms which modulate insulin degrading enzyme expression may increase susceptibility to Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2009; 1249: 1-8.

12. ANEXOS

Anexo 1. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE UNA MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA

1. Tomar una muestra de sangre periférica por punción venosa con sistema de vacío Vacutainer®; se tomó una muestra en tubos para la separación de suero y en tubos con EDTA o citratos para la separación de plasma.
2. Separar suero y plasma centrifugando a 4000 rpm por 15 minutos.
3. A partir del tubo con EDTA o citratos, transferir el botón celular a un tubo Falcon de 50 mL y llevar a un volumen de 40 mL con un buffer de lisis de glóbulos rojos (BLGR) 1x. Mantener en agitación por 5 minutos.
4. Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos; descartar el sobrenadante y resuspender el botón.
5. Repetir 4 y 5 tantas veces sea necesario para eliminar los eritrocitos presentes.
6. Decantar el BLGR 1x y resuspender el botón.
7. Agregar de 5-7 mL de la solución de lisis (Cell lysis solution) del kit comercial de QIAGEN® para la separación de DNA.
8. Incubar a baño maría a 55°C hasta la completa disolución del botón celular.
9. Agregar el volumen correspondiente de la solución precipitante de proteínas (Protein precipitation solution) del kit de QIAGEN® en proporción al volumen de la solución de lisis que se agregó. Mantener en agitación por 30 minutos.

10. Centrifugar a 4000 rpm por 30 minutos. Decantar en un tubo limpio y desechar el botón.
11. Repetir el paso 10 cuantas veces sea necesario para eliminar el precipitado de proteínas.
12. Decantar y desechar el botón. Agregar 2x el volumen en alcohol etílico absoluto de grado biología molecular y agitar; se observará la formación del DNA genómico.
13. Centrifugar a 2800 rpm por 20 minutos y desechar el sobrenadante.
14. Resuspender el botón con TE o con agua inyectable para llevarlo a un volumen final de 500-700 μ L.
15. Mantener en agitación a 500 rpm, a 55°C hasta la completa disolución del botón.
16. Cuantificar a 260 nm y verificar la integridad por electroforesis de un gel de agarosa al 0.8%.

Anexo 2. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE NEP Y ACE. LOS VALORES DE P , OR Y EL INTERVALO DE CONFIANZA CORRESPONDEN A LOS OBTENIDOS POR MEDIO DE Epi Info™.

Gen	SNP	Alelo	Casos	Control	p	OR	95% CI
NEP	rs989692	C	0.62	0.63	0.88	0.96	0.54-1.70
		T	0.38	0.37		1.04	0.59-1.85
	rs3736187	T	0.94	0.94	1.00	1.00	0.31-3.21
		C	0.06	0.06		1.00	0.31-3.21
	rs1025192	C	0.36	0.37	0.88	0.96	0.54-1.70
		T	0.64	0.63		1.04	0.58-1.86
	rs1816558	A	0.54	0.43	0.12	1.56	0.82-2.72
		G	0.46	0.57		0.64	0.37-1.12
ACE	rs4291	A	0.7	0.7	1.00	1.00	0.55-1.83
		T	0.3	0.3		1.00	0.55-1.83
	rs4343	A	0.6	0.62	0.77	0.92	0.52-1.62
		G	0.4	0.38		1.09	0.62-1.93
	rs4362	C	0.6	0.57	0.66	1.13	0.64-1.99
		T	0.4	0.43		0.88	0.50-1.55

Anexo 3. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS
EVALUADOS OBTENIDAS POR SNPStats.

Gen	SNP	Frecuencias genotípicas		
NEP	rs989692	C/C	C/T	T/T
	EA	0.36	0.52	0.12
	Control	0.4	0.46	0.13
	rs3736187	T/T	T/C	C/C
	EA	0.88	0.11	0.01
	Control	0.89	0.11	0.00
	rs1025192	C/C	C/T	T/T
	EA	0.14	0.43	0.43
	Control	0.11	0.52	0.37
	rs1816558	A/A	A/G	G/G
	EA	0.34	0.41	0.25
	Control	0.2	0.46	0.34
	rs2196521	A/A	A/G	G/G
	EA	0.44	0.21	0.35
	Control	0.29	0.3	0.41
ACE	rs4291	A/A	A/T	T/T
	EA	0.47	0.45	0.08
	Control	0.5	0.41	0.09
	rs4343	A/A	A/G	G/G
	EA	0.37	0.46	0.18
	Control	0.39	0.46	0.15
IDE	rs4362	C/C	C/T	T/T
	EA	0.37	0.46	0.17
	Control	0.37	0.41	0.22
	rs3758505	C/C	C/A	A/A
	EA	0.15	0.49	0.36
	Control	0.1	0.35	0.55
	rs4646953	A/A	A/G	G/G
	EA	0.76	0.22	0.02
	Control	0.83	0.15	0.01
	rs4646954	A/A	A/G	G/G
	EA	0.08	0.39	0.53
	Control	0.13	0.41	0.46
rs3781239	C/C	C/G	G/G	
EA	0.45	0.18	0.37	
Control	0.31	0.21	0.48	

Anexo 4. COMBINACIONES MULTILOCI OBTENIDAS PARA LOS
POLIMORFISMOS EVALUADOS.

Combinación	% EA	% Control
CCCAAACCGA	0.0	0.2
CCCATGTAA G	0.0	0.5
CCCGAACCAAG	0.0	0.4
CCCGTACCAA	0.0	0.2
CCTAAACCA G	0.0	0.2
CCTAAACCGA	0.0	0.2
CCTGAACAAG	0.0	0.4
CCTGAACCAA	0.4	0.5
CTCAAACAAA	0.0	1.5
CTCAAACAAG	5.0	2.4
CTCAAACCAA	0.0	2.3
CTCAAATAAG	0.0	2.0
CTCAAGTAAG	0.0	0.3
CTCATACAAG	0.0	0.6
CTCATATAAG	0.0	0.2
CTCATATCAA	0.0	0.4
CTCATGTAA G	1.4	4.4
CTCATGTAGA	0.0	0.1
CTCATGTAG G	0.0	0.9
CTCATGTCAA	2.0	0.7
CTCATGTCA G	1.0	0.3
CTCATGTCC G	0.3	0.3
CTCGAGTAAG	0.0	1.8
CTCGTATCAA	0.0	0.3
CTCGTGTA A A	0.0	0.4
CTCGTGTAAG	0.0	0.5
CTCGTGTC A A	0.6	0.9
CTTAAACAAA	2.5	3.0
CTTAAACAAG	0.9	0.5
CTTAAACCAA	0.6	0.9
CTTAAACCA G	9.0	0.1
CTTAAACCG G	0.9	0.2
CTTAAAGT A A A	0.0	0.2
CTTAAAGT A A G	0.7	0.8
CTTAAAGT A G A	0.0	0.3
CTTAAAGT C A A	0.0	0.9
CTTATAACCA G	0.4	0.2
CTTATATAAG	0.0	0.2
CTTATGT A A A	0.0	0.3
CTTATGT A A G	0.4	4.0
CTTATGT A G G	0.0	0.3

Combinación	% EA	% Control
CTTATGTCAA	0.0	0.3
CTTGAACAAG	4.2	11.8
CTTGAACCAA	2.6	8.1
CTTGAATAG G	0.3	0.2
CTTGAAGT A A G	3.1	2.5
CTTGAAGT A G G	0.0	0.3
CTTGTACAAG	0.0	0.4
CTTGTGT A A G	3.1	3.4
CTTGTGT A G G	1.5	1.7
TCCAAACCAA	0.0	0.3
TCCAAAGCC A A	0.0	0.2
TCCATGT A A G	0.5	0.0
TCTAAACAAA	0.0	0.2
TCTAAACAAG	0.3	0.2
TCTAAATAG G	0.0	0.1
TCTAAGT A A A	0.0	0.2
TCTATATAAG	0.0	0.3
TCTGAACAAG	0.0	0.2
TCTGAAGT A A G	0.0	1.1
TTCAAACAAG	2.2	1.4
TTCAAACAG A	0.0	0.9
TTCAAACAG G	0.5	0.1
TTCAAACCAA	2.5	0.4
TTCAAACCA G	0.0	0.4
TTCAAATAG G	0.0	0.2
TTCAAGT C A A	0.7	0.4
TTCATACAAG	0.3	1.2
TTCATATCAA	0.0	0.0
TTCATGCC A A	0.0	0.2
TTCATGT A A G	2.0	1.0
TTCATGT C A A	0.0	0.3
TTCATGT C A G	2.0	0.5
TTCGAACAAG	0.0	3.1
TTCGAACAG G	0.0	1.2
TTCGAATCAA	0.0	0.3
TTCGAGCAAG	0.0	0.2
TTCGAGT A A G	0.0	0.6
TTCGAGT C A A	0.0	0.7
TTCGTACAAG	0.0	0.5
TTCGTATAAG	0.0	0.4
TTCGTGT A A A	0.8	0.2

Anexo 4. COMBINACIONES MULTILOCI OBTENIDAS PARA LOS
POLIMORFISMOS EVALUADOS. Continuación.

Combinación	% EA	% Control
TTCGTGTAAG	0.4	0.8
TTTAAACCAA	0.9	1.3
TTTAAATAGG	0.0	0.2
TTTAAGCAAG	0.0	0.2
TTTAAGTAAA	0.4	0.9
TTTAAGTAAG	0.0	0.5
TTTAAGTCAA	0.0	0.0
TTTATACAAG	0.0	0.2
TTTATATAAG	0.0	0.2
TTTATGTAAG	0.8	0.8
TTTGAACAAA	0.4	0.5
TTTGAACAAG	10.5	4.8
TTTGAACAGG	0.5	0.5
TTTGAACCAA	0.0	4.0
TTTGAATAAA	0.0	0.2
TTTGAATAAG	0.5	0.2
TTTGAATCAA	0.0	0.6
TTTGAGCAAG	0.0	0.5
TTTGAGTAAG	0.4	1.1
TTTGAGTAGG	0.0	0.3
TTTGTGTAAG	0.0	0.5
TTTGTGTAGG	0.0	0.5
TTTGTGTCAA	0.0	0.6
CCCGTGCAAG	0.3	0.0
CCCGTGTCAA	0.2	0.0
CCTAAATCAG	0.3	0.0
CCTGAGTAGG	0.3	0.0
CCTGTGTAGG	0.3	0.0
CCTGTGTCAA	0.7	0.0
CTCAAACCGG	1.0	0.0
CTCAAATCAG	0.3	0.0
CTCAAGCCAG	0.3	0.0
CTCAAGTAAG	0.8	0.0
CTCAAGTAGA	0.5	0.0
CTCAAGTCAG	0.4	0.0
CTCATGCAAG	0.4	0.0
CTCATGCAGG	0.3	0.0
CTCGAACCAAG	2.3	0.0
CTCGAACCAA	0.9	0.0
CTCGAATCGG	0.3	0.0

Combinación	% EA	% Control
CTCGAGTAAG	0.5	0.0
CTCGAGTAGG	1.2	0.0
CTCGTGTCAG	0.5	0.0
CTTAAACAGG	0.7	0.0
CTTAAACCGA	0.2	0.0
CTTAAATAAG	0.3	0.0
CTTAAAGTAGG	0.3	0.0
CTTATACCAA	0.2	0.0
CTTATGCAAG	0.2	0.0
CTTATGTCAG	1.5	0.0
CTTGAATAAG	0.4	0.0
CTTGAGTCAA	0.5	0.0
CTTGTACCAA	0.4	0.0
CTTGTGCCAA	0.3	0.0
CTTGTGTCAA	4.3	0.0
CTTGTGTCTGA	0.4	0.0
TCCAAACAAA	0.3	0.0
TCCAAACAAG	0.4	0.0
TCCAAGCAAG	0.3	0.0
TCCGAACAGG	0.5	0.0
TCCGTGTAAG	0.5	0.0
TCTAAATAGA	0.3	0.0
TCTATGTAGG	0.3	0.0
TCTATGTCAA	0.3	0.0
TTCAAGCCAG	0.3	0.0
TTCATACAGG	0.4	0.0
TTCATGTAGG	0.2	0.0
TTCGAACCAA	0.4	0.0
TTCGAACCCAG	0.3	0.0
TTTAAACAAA	1.4	0.0
TTTAAACAAG	1.8	0.0
TTTAAACAGG	0.6	0.0
TTTAAACCGA	0.2	0.0
TTTAAAGTAGA	0.1	0.0
TTTAAAGTCGG	0.3	0.0
TTTATACAGG	0.2	0.0
TTTATGCCAG	0.3	0.0
TTTATGTAGG	0.5	0.0
TTTATGTCAA	0.6	0.0
TTTGAGCCAA	0.3	0.0
TTTGTGTAAA	0.3	0.0

Anexo 5. HAPLOTIPOS OBTENIDOS PARA LOS POLIMORFISMOS EVALUADOS.

% Frecuencia					
Gen	Combinación	EA	Control	<i>p</i>	OR
NEP	CCTA	0	0	1	*
	CCTG	1	1	1	1
	CTCA	16	16	1	1
	CTCG	4	5	1	0.79
	CTTA	19	13	0.33	1.57
	CTTG	22	27	0.51	0.76
	TCCA	1	0	1	*
	TCCG	1	0	1	*
	TCTA	1	2	1	0.49
	TCTG	1	2	1	0.49
	TTCA	8	7	1	1.15
	TTCG	6	8	0.78	0.73
	TTTA	9	5	0.41	1.88
	TTTG	11	14	0.67	0.76
	CCCA	0	0	1	*
	CCCG	0	1	1	*
ACE	AAC	55	53	0.89	1.08
	AAT	3	4	1	0.74
	AGC	1	1	1	1
	AGT	10	12	0.82	0.81
	TAC	2	3	1	0.66
	TGC	2	0.1	0.5	*
	TGT	27	25	0.87	1.11
	TAT	0	2	0.5	*
IDE	AAA	6	7	1	0.85
	AAG	45	57	0.12	0.62
	AGA	0	1	1	*
	AGG	9	7	0.79	1.31
	CAA	22	25	0.74	0.85
	CAG	14	1	0	16.12
	CGG	4	1	0.37	4.12

*No se puede definir debido a que las frecuencias son menores al 1%