



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN
LOS GENES DE LA PROTEÍNA TAU,
GSK3 β , Y PROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO (HSPs), EN PACIENTES
MEXICANOS CON ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOMEDICINA)

P R E S E N T A

DANIRA TORAL RIOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. VICTORIA CAMPOS PEÑA
COMITÉ TUTOR:

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

MÉXICO, D.F. A DE DICIEMBRE DEL 2011



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 05 de septiembre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOMEDICINA)** de la alumna **TORAL RIOS DANIRA** con número de cuenta **406059091** con la tesis titulada: **"IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES DE LA PROTEÍNA TAU, GSK3 β , Y PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs), EN PACIENTES MEXICANOS CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER."** realizada bajo la dirección de: **DRA. VICTORIA CAMPOS PEÑA**

Presidente:	DRA.	ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
Vocal:	DR.	MARCO ANTONIO MERAZ RÍOS
Secretario:	DR.	FEDERICO ÁVILA MORENO
Suplente:	DRA.	MARÍA DEL ROCÍO GÓMEZ ORTEGA
Suplente:	DR.	BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de octubre de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México**, por permitirme titularme con ellos por Estudios de Posgrado, comenzar a formarme como investigadora. También agradezco el **Apoyo Financiero PAEP 2011**, para asistir al Congreso Internacional “Neuroscience 2011”.

Al **CONACYT**, por brindarme el apoyo económico durante la Maestría (No. de Becario: 254288). La beca facilitó varias cosas en mi vida personal, lo cual se vio reflejado en mi buen desempeño como alumna.

A la **Dra. Victoria Campos Peña**, a quién admiro y respeto, desde que la conocí en el INNN. Gracias por ofrecerme este proyecto, por tu tiempo y dedicación, para el buen desarrollo de la maestría. Por siempre brindarme un buen ejemplo de superación y la oportunidad de trabajar a la par en otro de tus proyectos.

A la **Dra. Rosalinda Guevara Guzmán**, por su críticas constructivas, consejos durante la maestría y aportar ideas de mejoras al proyecto desde el tutorial cero, donde me abrió los ojos para mejorar mi forma de presentar. Al **Dr. Benjamín Florán Garduño**, por ser parte de mi comité tutorial, confiar en los buenos resultados que se podían obtener del proyecto y sus observaciones oportunas.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis **padres** por confiar en mí y en mis sueños, apoyarme en todo momento para que se cumplieran. A mis **hermanas**, por enseñarme que en la vida no solo era importante ser una estudiante dedicada. A mis **abuelitos**, por ser mi ejemplo de humildad y enseñarme que siempre hay que ver lo bueno de la vida. A mis tíos **Gaby y Lalo**, por preocuparse por mí en todo momento, por su apoyo en esta etapa de mi vida académica y los amenos momentos que me han otorgado.

Un merecido reconocimiento para la **Dra. María del Rocío Gómez Ortega**, quién le dio a este proyecto el enfoque de Genética Poblacional. Gracias Dra., por dedicar tiempo al proyecto y a mi aprendizaje. Te queremos Teresa!!!

A mi amiga **Erika Rodríguez**, quién me guió en cada uno de los trámites desde antes de iniciar la maestría. Creo que cada uno de los alumnos que ha pasado por tu oficina, tiene un motivo para agradecerte y una buena historia que contar de ti. Agradezco los buenos consejos y platicas amenas durante este año y medio.

A mis amigos **Ale Vane, Xchel, Victor, Jessica, Dani, Consuelo, Jorge y Erik**, por estar ahí en las buenas y en las malas, por ser mis hermanos, dejarme aprender algo nuevo de cada uno de ustedes y ser parte de mis locuras. A mis **compañeras de laboratorio** por hacer más gratas las horas de trabajo.

Gracias a la vida, por brindarme hasta el momento los años más hermosos, a pesar de los altibajos. Me ha demostrado que existen las segundas oportunidades para reflexionar y enderezar el camino.

Con cariño y profundo agradecimiento... Dani.

"Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender" **Marie Curie.**

DEDICATORIA

La presente Tesis la dedico a mis padres, los mejores que me brindó la vida. No me cansaré de agradecer su apoyo, amor y dedicación incondicional; lo cual ha sido fundamental para mi crecimiento académico y personal. Los amo!!! Espero les agrade.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. ÍNDICE DE FIGURAS_____	1
II. ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS_____	2
III. ABREVIATURAS_____	3
IV. RESUMEN/ABSTRACT_____	4
V. INTRODUCCIÓN	
5.1 Datos epidemiológicos de las demencias en la población_____	6
5.2 Características de la EA_____	8
5.3 Clasificación de la EA_____	10
5.4 Diagnóstico Clínico_____	10
5.5 El procesamiento de la PPA y formación de PN_____	12
5.5.1 Genes implicados en casos de EA de tipo familiar_____	15
5.6 La proteína Tau y su papel en la formación de MNF_____	16
5.7 GSK3 β , principal cinasa que fosforila a Tau y su relación con la EA_____	23
5.8 Degradación de la proteína Tau patológica_____	27
5.9 Estudios de asociación genética relacionados con la EA de tipo esporádico_____	30
VI. JUSTIFICACIÓN_____	35
VII. OBJETIVOS_____	36
VIII. HIPÓTESIS_____	37
IX. MATERIALES Y MÉTODOS	
9.1 Universo de trabajo_____	38
9.2 Obtención de muestra sanguínea_____	40
9.3 Extracción de ADN_____	40
9.4 Cuantificación y verificación de integridad de ADN _____	40
9.5 Selección de SNP y diseño de sondas TaqMan_____	41
9.6 Genotipificación de SNP mediante PCR Tiempo Real_____	45
9.7 Análisis estadísticos de los resultados_____	46

X.	RESULTADOS	
10.1	Frecuencias alélicas	49
10.2	Frecuencias genotípicas	51
10.3	Frecuencias de combinaciones multiloci y haplotipos	53
10.4	Equilibrio de Hardy-Weinberg	57
10.5	Desequilibrio de Ligamiento	58
10.6	Estructura genética poblacional	60
XI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
XII.	CONCLUSIONES	68
XIII.	BIBLIOGRAFÍA	69
XIV.	ANEXOS	
	Anexo I. Carta de Consentimiento Informado del Protocolo de Investigación	86
	Anexo II. Pacientes con Enfermedad de Alzheimer incluidos en el estudio	87
	Anexo III. Controles sanos incluidos en el estudio	88
	Anexo IV. Población abierta incluida en el estudio	89
	Anexo V. Metodología de extracción de ADN mediante kit	90
	Anexo VI. Resultados de genotipificación de 9 SNP en 50 pacientes con EA	91
	Anexo VII. Resultados de genotipificación de 9 SNP en 50 controles	92
	Anexo VIII. Resultados de genotipificación de 9 SNP en 50 individuos de la población general mexicana	93
	Anexo IX. Comparaciones estadísticas de las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados, entre pacientes con Alzheimer (A), Controles (C) y Población Abierta (PA)	94
	Anexo X. Comparaciones estadísticas de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados, entre pacientes con Alzheimer (A), Controles (C) y Población Abierta (PA)	96
	Anexo XI. Combinaciones multiloci encontradas en las muestras estudiadas	98
	Anexo XII. Diferencias estadísticas de la comparación de combinaciones multiloci	99

I. LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Alois Alzheimer_____	7
2. Dibujo de marañas neurofibrilares por Alzheimer_____	7
3. Comparación de cerebro humano normal con el de EA_____	8
4. Histopatología de la corteza cerebral de un caso con EA_____	9
5. Estudio de Imagen (SPECT) de paciente con EA_____	11
6. Vías de procesamiento de la PPA_____	12
7. Complejo γ -secretasa_____	13
8. Placa neurítica_____	13
9. El microtúbulo neuronal_____	16
10. Estructura de la proteína Tau_____	17
11. Isoformas de la proteína Tau_____	18
12. Sitios de fosforilación/defosforilación de Tau_____	19
13. Comparación de la fosforilación normal y patológica de Tau_____	20
14. Filamento helicoidal apareado_____	21
15. Maraña neurofibrilar_____	21
16. Vía Wnt/ β -catenina y su inhibición por $A\beta$ _____	25
17. Hipótesis de degradación de la proteína Tau patológica_____	29
18. Componentes y fundamento de la Genotipificación por PCR en Tiempo Real mediante tecnología TaqMan®_____	43
19. Detección de la señal de amplificación de los alelos y su discriminación_____	44
20. Prueba de las sondas para los 9 SNP, mediante la reacción estandarizada de PCR en Tiempo Real_____	45
21. Frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados_____	50
22. Frecuencias genóticas de los polimorfismos estudiados_____	52
23. Combinaciones multiloci más frecuentes en los pacientes con EA_____	54
24. Distribución de las muestras estudiadas en 3 subpoblaciones_____	61
25. Proporciones de la composición genética de cada individuo estudiado_____	61
26. Resultado de la corrección de las proporciones alélicas y genóticas debido a la subestructuración de la población_____	62

II. LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Genes involucrados en la EA Familiar de inicio temprano_____	15
2. Datos generales de edad promedio y sexo, presentados en los grupos de estudio incluidos en este proyecto_____	40
3. Polimorfismos de Cambio de un solo Nucleótido (SNP) seleccionados para nuestro estudio de asociación genética_____	41
4. Estandarización para una reacción de PCR en Tiempo Real_____	45
5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados_____	49
6. Comparación estadística para el Alelo A del polimorfismo rs334558_____	50
7. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados_____	51
8. Comparación estadística para los genotipos del polimorfismo rs334558_____	52
9. Composición de combinaciones multiloci más frecuentes en los pacientes con EA_____	53
10. Distribución de las combinaciones multiloci más frecuentes_____	53
11. Haplotipos del gen de la proteína tau, presentes en las muestras estudiadas_____	55
12. Frecuencias haplotípicas en el gen de la proteína tau_____	56
13. Frecuencias haplotípicas del gen de GSK3 β , presentadas por los individuos analizados_____	57
14. Determinación del Índice de Fijación de Wright para cada locus estudiado_____	58
15. Determinación del Desequilibrio de Ligamiento en el grupo de pacientes con EA_____	59
16. Determinación del Desequilibrio de Ligamiento en el grupo de Controles_____	59
17. Determinación del Desequilibrio de Ligamiento en el grupo de Población Abierta_____	59
18. Resultados de la determinación del $-\ln P$, para cada “k” estimada_____	60
19. Estudios de interacción de GSK3 β con otros loci_____	67

III. ABREVIATURAS

A β	Péptido Amiloide Beta
aa	Aminoácido
ADI	Asociación Internacional de la Enfermedad de Alzheimer
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNg	Ácido desoxiribonucleico genómico
AICD	Dominio intracelular de la PPA
ApoE	Apolipoproteína E
APA	Asociación Americana de Psiquiatría
α PPAs	Fragmento soluble α de la PPA
β PPAs	Fragmento soluble β de la PPA
Ca ²⁺	Calcio
CHIP	Proteína ligada a HSP70 mediante su extremo carboxilo.
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
dNTP's	Dinucleótidos trifosfatados
EA	Enfermedad de Alzheimer
EQHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
FHA	Filamento helicoidal apareado
Fis	Índice de Fijación de Wright
Fz	Receptores Frizzled
HSP	Proteínas de Choque Térmico
INN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
LD	Desequilibrio de Ligamiento
MAPs	Proteínas asociadas al microtúbulo.
MNF	Marañas neurofibrilares
MTs	Microtúbulos
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NMDA	N-metil-D-Aspartato
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PN	Placas neuríticas
PPA	Proteína precursora del amiloide
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Rojo de Tiazina
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
Ser	Serina

IV. RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia senil más frecuente, se caracteriza clínicamente por la pérdida gradual de la memoria y a nivel histopatológico por la presencia de Placas Neuríticas y Marañas Neurofibrilares (MNF). El Filamento Helicoidal Apareado es la unidad principal que constituye a las MNF y se encuentra compuesto mayoritariamente por la Proteína Tau en forma hiperfosforilada y truncada. Tau es una proteína que se asocia a los microtúbulos neuronales y los estabiliza, promoviendo el transporte axonal de vesículas y organelos. Cuando la proteína se fosforila, pierde su capacidad de unión al microtúbulo y genera la despolimerización de la tubulina. Este fenómeno ocurre normalmente, pero en condiciones patológicas, se altera el balance entre la fosforilación y desfosforilación de la proteína. La principal cinasa involucrada en la fosforilación de Tau en condiciones fisiológicas y patológicas, es GSK3 β . Se ha propuesto que ante la agregación de Tau, se activa una respuesta de rescate celular mediada por Proteínas de Choque Térmico, HSP70 y HSP90. Estudios recientes de asociación genética muestran que algunas variantes en los genes de las proteínas Tau, GSK3 β y las HSP-70, podrían representar un factor de riesgo para desarrollar la Enfermedad de Alzheimer. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue analizar polimorfismos de cambio de un solo nucleótido (SNP) en los genes de las proteínas mencionadas y determinar su posible asociación con el incremento en la susceptibilidad para desarrollar EA en la población Mexicana. Para ello se genotipificaron 5 SNP en el gen de Tau, 2 en el gen de la cinasa GSK3 β , 1 en el gen de la proteína HSP70-1 y otro en el gen de la proteína HSP70-5, mediante PCR Tiempo Real, en 50 pacientes con diagnóstico clínico de EA de tipo esporádico, 50 controles pareados por edad y 50 individuos de la población general mexicana. Nuestros resultados sugieren que, el alelo A y genotipo AA del polimorfismo rs334558 localizado en el gen de GSK3 β , podrían asociarse con el incremento en el riesgo a desarrollar la Enfermedad de Alzheimer en nuestra población. Por otra parte, se identificaron 3 genotipos multiloci derivados de las combinaciones de variantes alélicas en los genes de la proteína Tau, la cinasa GSK3 β y las HSPs, que podrían asociarse al incremento en la susceptibilidad para desarrollar la EA en la población mestiza mexicana. Durante la última década, se han reportado asociaciones de variantes alélicas que podrían conferir un riesgo para desarrollar EA; sin embargo no todos los resultados se han replicado. Consideramos que esta discrepancia se debe a que la mayoría de ellos no consideran la complejidad genética de las muestras analizadas.

ABSTRACT

Alzheimer disease (AD) is the most frequent cause of dementia, clinically is characterized by a progressive loss of memory and histopathologically by the presence of Neuritic Plaques and Neurofibrillary Tangles (NFT). The unit of NTF is the paired helical filaments which are formed by Tau protein in an abnormal hyperphosphorylated and truncated form. Tau is a microtubule-associated protein which under physiological conditions stabilizes neuronal microtubules, promoting the axonal transport of vesicles and organelles. When the protein is phosphorylated, loses its microtubule-binding capacity allowing the tubulin depolymerization. This occurs normally, but in pathological conditions the balance between phosphorylation and dephosphorylation of protein is altered. The main kinase implicated in physiological and abnormal Tau phosphorylation is GSK3 β . It has been documented that a possible cellular rescue could be activated by chaperones as HSP-70 and HSP-90. Recent studies of genetic association indicated that variations in the genes of Tau, GSK3 β and HSP70 might be a genetic risk factor for Alzheimer's disease. The aim of this study is to analyze polymorphisms of single nucleotide (SNP) in Tau (5 SNP), GSK-3 β (2 SNP), HSP70-1 (1 SNP) and HSP70-5 (1 SNP) genes; and their association with the risk to develop AD in Mexican population. We genotyped those SNPs using qPCR, in 50 clinically diagnosed patients with AD, 50 paired age controls and 50 individuals of general Mexican population. The results suggest that A allele and AA genotype, could be associated with the risk to develop AD in our population. Moreover, we found 3 multiloci variants of Tau, GSK3 β , HSP70-1 and HSP70-5 genes, that could be associated with the risk to develop AD in Mexican Mestizo population. During the last decade, positive associations between Alzheimer's Disease and hundreds of new candidate genes have been reported. However, we realized that some results of associations have not been further replicated. We think that some of these studies have reported false associations, because the authors haven't considered the genetic complexity of their samples.

V. INTRODUCCIÓN

5.1 Datos epidemiológicos las demencias en la población.

La demencia senil y los accidentes cerebrovasculares se están convirtiendo en el tercer problema de salud en países desarrollados, detrás de los accidentes cardiovasculares y el cáncer. En el 2001, se estimó que 24.2 millones de personas padecían demencia en todo el mundo, y 4.6 millones de nuevos casos se desarrollaban anualmente. Dos tercios de toda la población con demencia estudiada, vivía en países en vías de desarrollo, se prevé que las cifras se duplicarán cada 20 años, siendo el incremento más brusco en estos países en comparación con los países de alto desarrollo (Ferri, et. al., 2005).

La Asociación Internacional de la Enfermedad de Alzheimer (ADI) estimó que existirían 35.6 millones de personas en todo el mundo con demencia en el año 2010. También se ha calculado que esta cifra casi se duplique cada 20 años, hasta los 65.7 millones en 2030, y los 115.4 millones en 2050. Gran parte de este crecimiento se puede atribuir claramente al incremento en el número de personas con demencia en países de renta baja y media (ADI, 2009).

En México, existen pocos estudios que señalen cuál es la prevalencia de las demencias. El grupo de estudio DSM-IV (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Transtornos Mentales, 1994) perteneciente a la Asociación Americana de Psiquiatría (APA), obtuvo una prevalencia de 3.2% en áreas urbanas y 2.4% en áreas rurales. El grupo 10/66 de la ADI determinó una prevalencia de 1.4% en áreas urbanas y 7.3% en áreas rurales, sugiriendo que la prevalencia es alta en países en vías de desarrollo (Libre, et. al., 2008). Cabe señalar, que estos estudios señalan la prevalencia de las demencias en general, ya que hasta el momento no existen estudios que señalen la incidencia de la demencia tipo Alzheimer en pacientes mexicanos.

Del total de enfermos con demencia senil, el 50-70% son casos con Enfermedad de Alzheimer (EA) (Hofman, et. al., 1991). El impacto que esta enfermedad y otras demencias ejercen sobre las sociedades; puede considerarse una epidemia que aumenta a la par del envejecimiento de la población en todo el mundo. El poco reconocimiento, el subdiagnóstico y el estigma, son problemas importantes para las personas con demencia y sus familiares, en países y comunidades de todos los tamaños y de todos los niveles de desarrollo (Anzola-Pérez, et. el, 1996).

En México, los datos estadísticos de la EA no parecen reflejar las cifras esperadas para nuestra distribución de población ya que, por ejemplo, en 1990 se registraron únicamente 111 defunciones por EA, de las cuales 56 correspondieron a hombres y 55 a mujeres. Sin embargo, a través de estimaciones indirectas con modelos epidemiológicos ha sido posible estimar la prevalencia en México que podría alcanzar el 5% entre la población de mayores de 60 años (Gutiérrez, 2001).



Fig. 1 Alois Alzheimer. (García, et. al., 2009)

En 1901 el patólogo psiquiatra alemán Alois Alzheimer (Fig. 1) atendió en el asilo del Hospital de Frankfurt a la paciente de 51 años, Auguste D., quien presentaba pérdida de memoria, desorientación y alucinaciones. La paciente muere el 8 de abril de 1906 y su cerebro fue donado a Alzheimer, quién hizo estudios anatomopatológicos, y descubrió que, la corteza cerebral era más estrecha de lo normal (atrófica). Alzheimer presentó este caso como una enfermedad inusual de la

corteza cerebral (Alzheimer, 1907). En 1910, su alumno Emil Krapelin designó a esta nueva enfermedad con el apellido de su maestro (Kraepelin, 1910). En 1911,

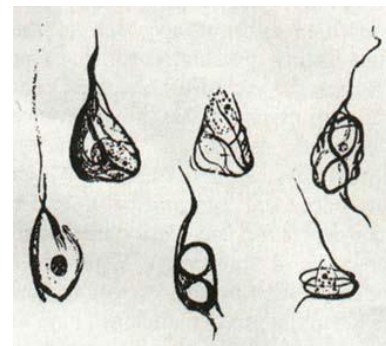


Fig. 2 Dibujo de marañas neurofibrilares por Alzheimer. (García,et. al., 2009)

Alzheimer describe clínicamente e histopatológicamente, el caso del paciente Johann F. (Alzheimer, 1911) (Fig. 2).

5.2 Características de la EA.

La Enfermedad de Alzheimer es la causa más frecuente de demencia en la población de 50-60 años, en ella intervienen factores ambientales y genéticos (Dartigues, 2009). La demencia se define como el desarrollo de múltiples déficits cognitivos que incluyen la pérdida de la memoria, déficit en la capacidad de producir o comprender lenguaje (afasia), alteraciones para realizar movimientos coordinados (apraxia) o responder a estímulos (agnosia); lo cual provoca una discapacidad general que impide que el paciente sea capaz de realizar las tareas cotidianas (DSM-IV, 1994).

Sus etapas iniciales se caracterizan por la disminución en la percepción espacial, así como desorientación en tiempo y espacio (Fig. 3). En las etapas tardías se presenta un aumento en el tono muscular, desinhibición emocional notable y el hundimiento de la personalidad normal del individuo. Otros datos clínicos comunes son la pérdida del control de esfínteres, disminución de peso y, finalmente, el paciente termina en estado vegetativo (McKhann G, et. al., 1984).

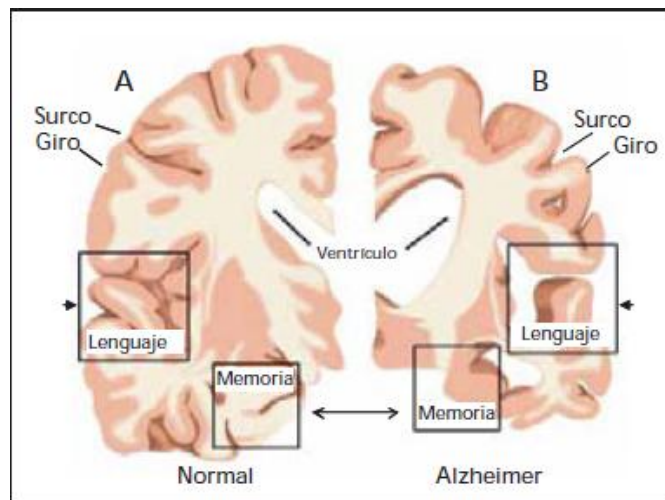


Fig. 3 Comparación de cerebro humano normal con el de EA.

Esta imagen representa un corte frontal del cerebro humano. En la izquierda (A) se representa el cerebro de un individuo normal y a la derecha (B) de un individuo con Alzheimer. Se observa que

existe una reducción global del tejido. Los surcos en el cerebro se ensanchan notoriamente. De igual manera, los ventrículos que contiene el líquido cefalorraquídeo se agrandan. La memoria a corto plazo se pierde al afectarse las células en el hipocampo (recuadros señalados con flechas). Cuando la enfermedad de Alzheimer se extiende a través de la corteza cerebral (capa exterior del cerebro) la capacidad de juicio se altera además de presentarse daño en el lenguaje (recuadro señalado con cabeza de flecha) (<http://www.ahaf.org/alzdis/about/adabout.htm>).

Macroscópicamente se observa una atrofia simétrica y consecuente disminución de la masa cerebral en áreas corticales (Perry, et. al., 1984), con atrofia de todos los lóbulos, aunque generalmente el más afectado es el temporal. En la región subcortical, la amígdala se ve gravemente afectada (Pearson, et. al., 1985).

En un estudio histológico post-mortem del tejido cerebral de pacientes con EA, es posible observar la presencia de dos lesiones neuropatológicas (Fig. 4), que acompañan la pérdida sináptica y muerte neuronal, que definen a nivel histopatológico la EA. Estas son las Placas Neuríticas (PN) y las Marañas Neurofibrilares (MNF) (Khan & Alkon, 2010).

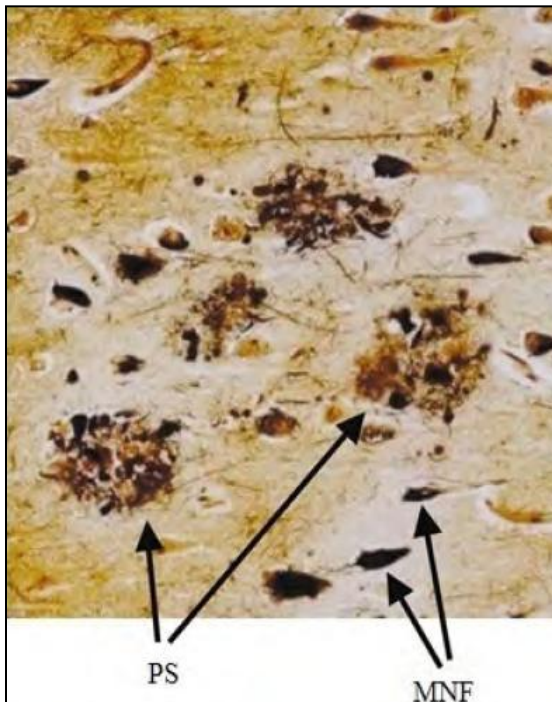


Fig. 4 Histopatología de la corteza cerebral de un caso con EA. Muestra la presencia de PS y MNF, típicas lesiones neuropatológicas relacionadas con la EA. (Blennow, et. al., 2006).

5.3 Clasificación de la EA.

De acuerdo a su etiología, la EA puede clasificarse en dos grupos, esta clasificación toma como criterios la edad de presentación de los síntomas y la posible relación con una historia familiar. Estos grupos son:

-EA de inicio precoz o temprano (5-10%), que se relaciona con una herencia familiar de tipo autosómica dominante, comienza antes de los 65 años de edad y está asociada con la presencia de mutaciones en proteínas específicas.

-EA de inicio tardío (90-95%), son casos de tipo esporádico que se presentan después de los 65 años. Se desconoce la causa, pero se asocian a factores genéticos, ambientales y nutricionales (Heyman, et. al., 1987; Bird, 2003).

5.4 Diagnóstico Clínico.

Un médico especializado tiene un 80% a 90% de probabilidades de diagnosticar correctamente la EA. El diagnóstico de Alzheimer se realiza, tomando en cuenta los siguientes criterios:

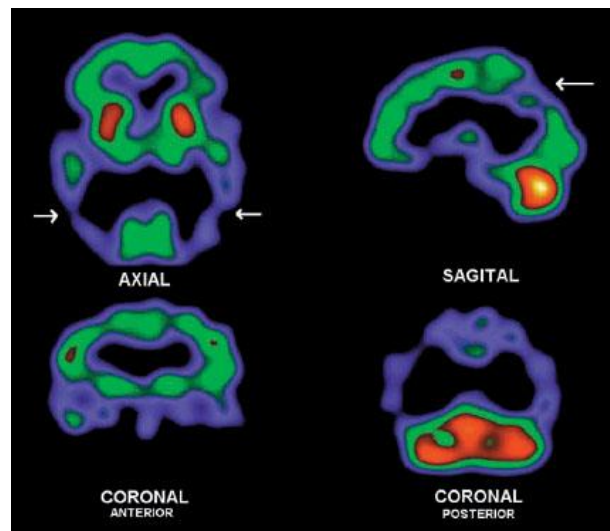
- ✓ Historia Clínica: en la cual se buscan antecedentes familiares del paciente y síntomas de demencia. Esto, considerando que hubiesen familiares afectados.
- ✓ Examen Neuropsicológico: Existen diferentes criterios para establecer el diagnóstico de la demencia; los más utilizados son los incluidos en la prueba contenida en el estudio del grupo DSM-IV de la APA (Reisberg ,2006) y los definidos por el NINCDS-ADRDA (Dubois, et. al., 2007). Para evaluar las demencias se pueden utilizar gran número de pruebas de detección entre los que destaca el Mini Mental State Examination (MMSE), que evalúa la orientación, el registro de información, la atención y el cálculo; el recuerdo, el lenguaje y la construcción (Dalla Barba, et al., 2008).

✓ Estudios de Imagen:

-Tomografía Computarizada (TC) y Resonancia Magnética (RM): con esta técnica es posible excluir lesiones estructurales que causen signos clínicos de demencia, como los tumores y coágulos. La mayoría de los pacientes con EA, presentan una atrofia cerebral con mayor dilatación de los surcos y mayor extensión de los ventrículos, en comparación a un cerebro que también enfrenta el proceso de envejecimiento (Stonnington, et. al., 2010).

-Tomografía Computarizada de Fotón Simple (SPECT) y Tomografía de Emisión de Positrones (PET): determinan si existe reducción de la actividad cerebral y las áreas afectadas (Fig. 5) (Illán, et. al., 2010).

Fig. 5 Estudio de Imagen (SPECT) de paciente con EA. En áreas azules se observa marcada disminución global de la perfusión cortical, de predominio temporo-parietal bilateral (imagen axial, sagital [flechas] y coronal posterior); con relativa preservación de la corteza sensorio-motora (imagen coronal anterior). Los núcleos basales y estructuras infratentoriales se aprecian de perfusión conservada (cerebelo en tono más intenso). (Quintana, 2002).



✓ Estudio histopatológico post mortem: Sigue considerándose como el único diagnóstico definitivo de EA. Se obtiene mediante autopsia el tejido cerebral de zonas hipocampales y de isocorteza, se realizan tinciones, y determina mediante análisis por microscopía se observa la presencia de PN y MNF, confirmando el diagnóstico de la enfermedad.

Algunos protocolos de investigación clínica, detectan en el líquido cefalorraquídeo una disminución del A β y un incremento de la proteína Tau hiperfosforilada (Blennow & Hampel, 2003).

5.5 El procesamiento de la PPA y formación de PN.

La PPA es una glicoproteína transmembranal que consta de 770 aa, tiene 3 dominios: N^o-terminal (extracelular), A β (membranal) y C^o-terminal intracelular (Zheng & Koo, 2006). Está relacionada con procesos de proliferación y adhesión celular, y fuertemente ligada al desarrollo y plasticidad neuronal (Spire, et. al., 2007). Su procesamiento se lleva a cabo por dos vías (Fig. 6):

- ❖ No amiloidogénica: La PPA es cortada entre los aa 687 y 688, del dominio A β , por la enzima α -secretasa. Como resultado de este corte, se libera el extremo extracelular de la proteína que se denomina α PPAs. Anclado a la membrana, deja el fragmento C83, que es escindido por el complejo multiproteico de la γ -secretasa (Fig. 7), produciendo el péptido P3, el cual es pequeño y soluble (Allinson, et. al., 2003).
- ❖ Amiloidogénica: La β -secretasa corta la proteína en los aa 671 y 672, liberando β PPAs y deja anclado a la membrana el fragmento C99 de la proteína. Este último es procesado por el complejo γ -secretasa, en los residuos 712, 714 o 715, y así se pueden producir 3 péptidos A β , de 40, 42 y 43 aa (De Strooper & Annaert, 2000).

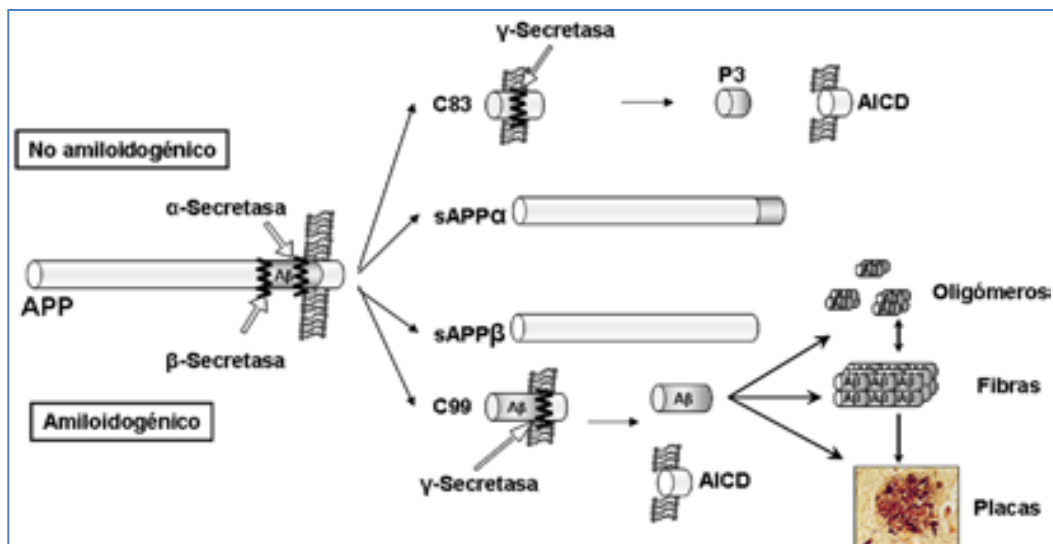


Fig. 6 Vías de procesamiento de la PPA. En la parte superior se observa la vía no amiloidogénica de la PPA procesada por la α -secretasa y el complejo γ -secretasa, obteniéndose un péptido soluble conocido como p3. En la parte inferior se representa la vía amiloidogénica de la proteína cuando es cortada por la β -secretasa y el complejo de la γ -secretasa, produciendo fragmentos de β A, que pueden oligomerizarse y formar las PN (Simón, et. al., 2010).

El A β puede depositarse de forma no agregada, localizándose en el cuerpo de las neuronas, esto se conoce como depósito inmaduro. Cuando unidades del A β maduran, se agregan formando oligómeros y fibras de amiloide, que a su vez pueden unirse y formar las PN, que por su densidad se localizan extracelularmente en prolongaciones nerviosas y su depósito atrofia las conexiones sinápticas (Sakono, et. al., 2010). El A β_{40} es la forma más abundante del péptido en el cerebro, aunque el A β_{42} , es considerado el más fibrillogénico y abundante en los núcleos de las PN (Matthias, et. al., 2010).

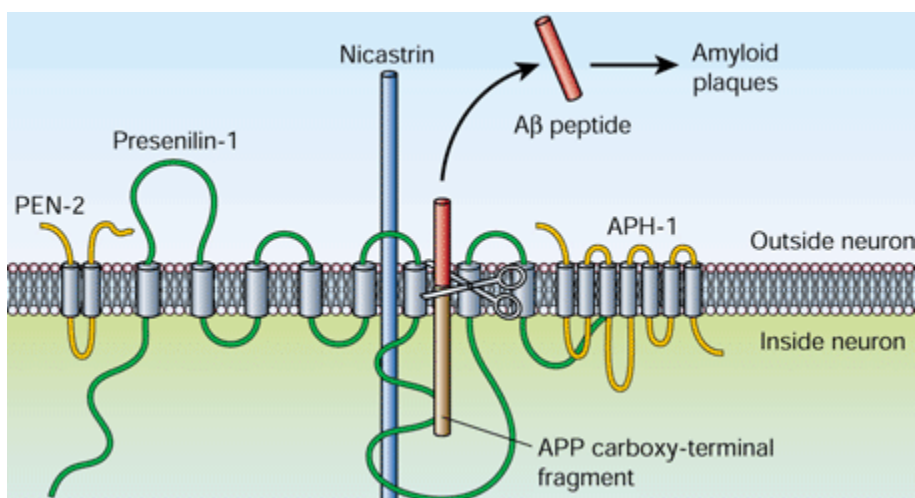


Fig. 7 Complejo multiproteico de la γ -secretasa. Conformado por las enzimas Presenilina 1 y 2, Nicastrina y la proteína APh-1. (De Stroop & Woodget, 2003).

Las PN son agregados esféricos de 10-100 μm de diámetro, los núcleos de oligómeros de βA , puede estar rodeado por astrocitos reactivos y células de la microglia, localizados en la neocorteza, hipocampo y amígdala (Fig. 8). También se han encontrado filamentos derivados a partir de la agregación de la proteína Tau, ApoE, antiqumiotripsina y glucosaminoglucanos (Butterfield D., 2002). Las PN son lesiones propias de la EA. Sin embargo, podemos encontrar depósitos de amiloide en otras patologías, así como en sujetos mayores sin demencia (Morán, et. al., 1992).

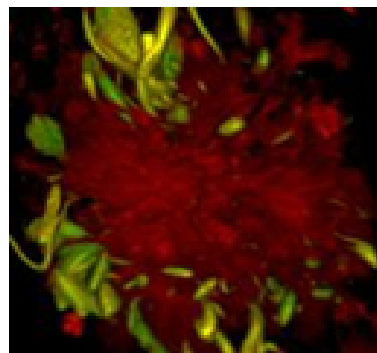


Fig. 8 Placa Neurítica. En rojo observamos Rojo Tiazina el cual tiñe estructuras β -plegadas, presentes en la placa neurítica. (Mena, et. al., 2003).

Las PN activan a la microglia, astrocitos y macrófagos; los cuales producen citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α , que contribuye a la toxicidad del péptido en la patología de la EA (Weiner & Frenkel, 2006). Por otro lado y como parte de un mecanismo de rescate celular ante la sobreproducción del A β , estas células presentadoras de antígeno, actúan en el aclaramiento del péptido, internalizándolo mediante receptores membranales, para su degradación a través de proteasas como Neprilisina y Enzima convertidora de Endotelina (Morelli et. al., 2005). Durante el curso de la EA, el aclaramiento del β A es rebasado por su sobreproducción, por tal motivo, este mecanismo de rescate se vuelve ineficiente.

Otro aspecto de la toxicidad del péptido en la EA, sucede a nivel mitocondria. Se ha propuesto que el péptido A β puede ser transportado hacia el interior, a través de los transportadores de membrana mitocondrial TOM40 y TIM23. Dentro de la mitocondria, desencadena un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e interacciona con los complejos mitocondriales (principalmente complejo IV mitocondrial y ATP sintetasa) de la cadena respiratoria. Esto favorece una disminución en el potencial de membrana y en la producción de energía y la posterior salida del Citocromo c, con lo cual se activa la apoptosis. Se sugiere, que además de importarse el péptido a la mitocondria, PPA forma complejos con los transportadores mencionados y puede procesarse en la membrana mitocondrial, lo que conduciría a una mayor formación del péptido A β , y favorecería el incremento en la disfunción mitocondrial (Pagani & Eckert, 2011).

Por otro lado, se sabe que el A β tiene la capacidad de interaccionar con componentes de la membrana plasmática incrementando así su permeabilidad; esto trae como consecuencia la entrada masiva de Ca²⁺ al citosol, el cual, se suma al Ca²⁺ liberado por el retículo endoplásmico (por estrés debido a la alta producción de ROS), promoviendo no sólo la activación de la vía apoptótica, sino también capaz de activar la vía amiloidogénica (Barrow & Small, 2007). El amiloide interacciona con los receptores a Glutamato, NMDA, promoviendo excitotoxicidad por la entrada de Ca²⁺ a la célula (Barrow & Small, 2007). Otro aspecto importante, es que los péptidos tienen la capacidad de unirse con alta afinidad, a

receptores nicotínicos de acetilcolina ($\alpha7nAChR$) y de esta manera, pueden contribuir a la disminución de la señalización colinérgica y liberación de acetilcolina en la EA.

Finalmente, también se ha propuesto que esta unión podría alterar vías de fosforilación, al sobreactivar ciertas cinasas; entre ellas GSK3, la cual se sabe fosforila a la proteína Tau, alterando la estabilidad neuronal y conduciendo a la formación de la MNF, como otro tipo de lesión característica de la EA (Wang, et. al., 2002).

5.5.1 Genes implicados en casos de EA de tipo familiar.

Los estudios reportados en la literatura, han demostrado que personas con enfermedad de Alzheimer de tipo familiar, muestran un patrón de herencia autosómica dominante, en la cual están implicados tres genes causales: el que codifica para PPA, el de PSEN1 y el de PSEN2 (Tabla 1). La presencia de mutaciones en estos genes, acelera la evolución de la enfermedad, de tal forma que el paciente tiene una esperanza de vida de 30-42 años de edad (Rademakers, et. al., 2003).

Tabla 1. Genes involucrados en la EA Familiar de inicio temprano. (Séto-Salvia & Clarimón, 2010)

Locus	Gen (símbolo)	Cromosoma	Proporción	Edad de Inicio (media \pm DE)
AD3	<i>PSEN1</i>	14q24.3	20-70%	44 \pm 8 años
AD1	<i>APP</i>	21q21	10-15%	49 \pm 7 años
AD4	<i>PSEN2</i>	1q31-q42	< 1%	59 \pm 7 años
DE: desviación estándar.				

En la actualidad, se han descrito alrededor de 30 mutaciones en el gen de la PPA en 83 familias principalmente de origen Europeo y Estadounidense, lo que representa el 10% de estas formas genéticas tempranas de EA. Estas mutaciones se encuentran ubicadas en regiones críticas para el procesamiento fisiológico la proteína y afectan significativamente su metabolismo normal ([http:// www.molgen.ua.ac.be/ADMutations](http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations)).

Las presenilinas son enzimas pertenecientes al complejo macromolecular γ -secretasa, que participa en el procesamiento de la PPA, para la formación de los fragmentos insolubles de β A. Mutaciones en el gen PSEN1 y PSEN2 causan un incremento en la actividad del complejo γ -secretasa, aumentándose la producción del péptido β A (Selkoe, 1999).

Se han identificado en la región codificante del gen de PSEN1, más de 120 mutaciones distintas, que pueden cambiar un aminoácido por otro o que afectan al procesamiento del ARN mensajero. Estas mutaciones son las más agresivas, debido al inicio precoz de los síntomas y a la rápida evolución de la EA (Cruts, et. a., 1998). En el gen de PSEN2 se reportan 14 mutaciones que afectan el dominio transmembranal de la proteína (Rogaev, et. el., 1995; Séto-Salvia & Clarimón, 2010).

5.6 La proteína Tau y su papel en la formación de MNF.

La morfología neuronal está dada por el citoesqueleto; uno de sus componentes esenciales de esta estructura son los microtúbulos (MTs), que intervienen en la formación de axones y dendritas, transporte axonal y regulación de la muerte celular (Bamburg, et. al., 1986) (Fig. 9). Para llevar a cabo sus actividades dinámicas, de transporte vesicular y de organelos, los MTs se asocian mediante interacciones electrostáticas a proteínas de unión a microtúbulos (MAPs). La funcionalidad de estas proteínas está regulada por eventos de fosforilación y desfosforilación que promueven la estabilidad de los MTs; las principales son: MAP1, MAP2 y Tau (Matus, 1998).

La proteína Tau se encuentra mayoritariamente en los MTs del axón de la neurona; es altamente soluble y estable al calor, cuenta con estructura primaria debido a su alto contenido en prolina y glicina (Cleveland, et. al.,

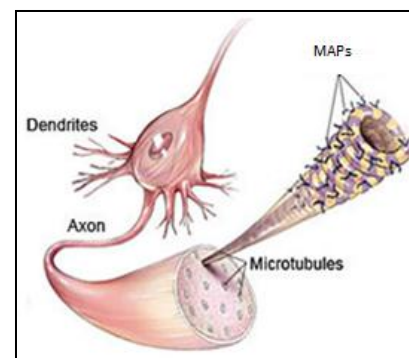


Fig. 9 El microtúbulo neuronal. Los MTs se encuentran asociados a MAPs. (<http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/brain-nerve-cells.html>.)

1977). La molécula se organiza en dos dominios (Fig. 10):

- El extremo amino, contiene al dominio de proyección, el cual posee una región acídica, que se proyecta hacia el espacio extracelular permitiendo su interacción con filamentos de actina, filamentos intermedios, neurofilamentos así como con componentes de la membrana plasmática. Cuenta además con una región rica en prolina, la cual presenta gran cantidad de residuos susceptibles a ser fosforilados por la acción de diversas cinasas. En este dominio se da interacciones con otras proteínas o cationes (Brandt, et. al., 1995).
- El extremo carboxilo contiene una región que consta de tres o cuatro dominios repetidos, a través de los cuales se lleva a cabo la interacción con los microtúbulos (Goode, etl al., 1997).

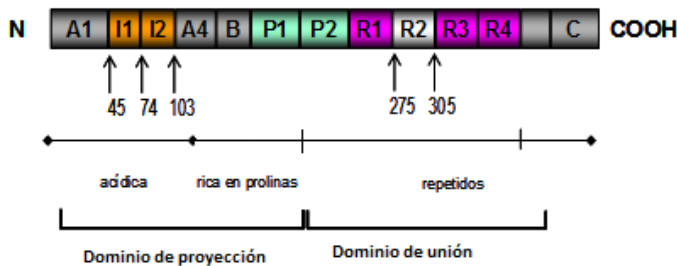


Fig. 10 Estructura de la proteína Tau. Los dominios repetidos de unión al microtúbulo, están señalados como R1, R2, R3, R4. Es a través de estos dominios, que la proteína lleva a cabo su función biológica (Campos-Peña & Meraz-Ríos, 2006).

El gen de Tau se localiza en el cromosoma 17q21, ocupando una región de 100 Kb. El transcrito primario contiene 16 exones. Los exones 4A, 6 y 8 no están presentes en el cerebro humano, porque son específicos de proteínas tau periféricas. El exón 4A se ha encontrado en tejidos periféricos de bovinos, humanos y roedores con un alto grado de homología (Lee, et. al., 1988). Los exones 6 y 8 no se han encontrado en el mRNA de humanos. Algunos transcritos con el exón 8 se han encontrado en cerebros de bovinos y monos Rhesus (Lu, et. al., 1994).

La región 5' del exón 1 no se traduce, pero contiene secuencias promotoras para Tau (como AP2 y SP1). Los exones 1,4,5,7,9,11,12 y 13 son exones constitutivos. El exón 14 se encuentra en el mRNA pero no es traducido a proteína. Los exones 2, 3 y 10 son cortados

alternativamente originándose 6 isoformas diferentes (+2,-3,-1,0-), (+2,+3,-1,0-), (+2,+3,+1,0-), (+2,-3,-1,0+), (+2,+3,-1,0+) (+2,+3,+1,0+) y son específicos del cerebro humano adulto (Fig. 11). El exón 3 nunca aparece independiente del exón 2 (Goedert, et al., 1989). Las variantes de tau difieren por la presencia de 3 o 4 regiones repetidas en el extremo carboxilo codificadas por los exones 9-12 y por la ausencia o presencia de 1 o 2 insertos (29 o 58 aa) en el extremo amino; los cuales son codificados por los exones 2 y 3. Debido al corte y empalme se obtienen las 6 isoformas de Tau que varían desde 352-441 residuos de aminoácidos (Ávila, et. al., 2004).

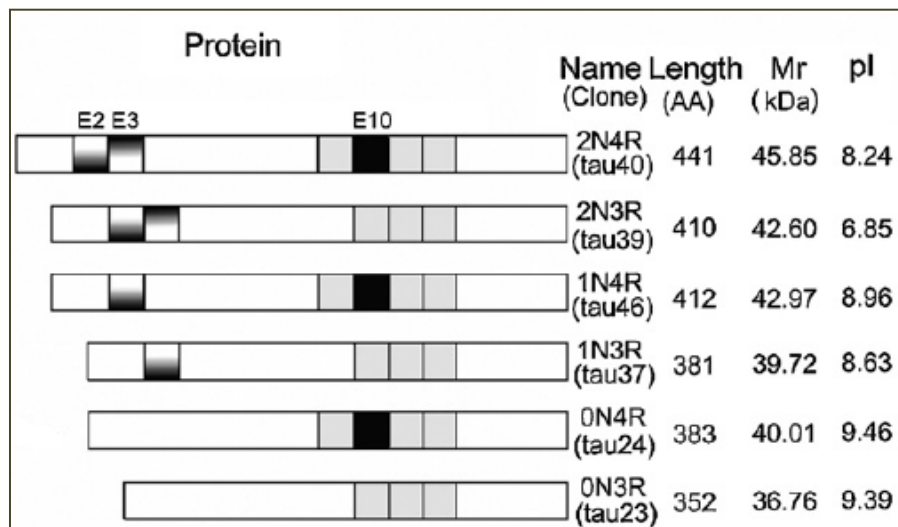


Fig. 11 Isoformas de la proteína Tau. En cada una se observa el número de insertos (E2 y E3) derivados del exón 2 y 3, al igual que el número de dominios repetidos (3R ó 4R) que le correspondió a cada uno por el corte y empalme de los exones 9-12 (Wang, et. al, 2008).

Las isoformas con 4R, son más eficientes en unirse al microtúbulo en comparación con las de 3R; esto se debe a la afinidad que en conjunto suman el primer y segundo dominio (Goode, et. al., 1997).

Sin embargo y a pesar de ser una proteína muy estable, Tau puede adquirir cambios conformacionales, que la hacen susceptible de agregación. Estos cambios conformacionales, son el resultado de modificaciones postraduccionales como son: glicosilación, ubiquitinación, oxidación, nitración, truncación (Glu391, Ser421) y

fosforilación. Esta última hasta la fecha es la más estudiada debido a su relación directa con la función de estabilización al MT neuronal (Ávila, et. al., 2004).

La fosforilación de Tau en sitios específicos es el principal mecanismo por el cual, se regula la función normal de la proteína. Existe evidencia en la literatura, que demuestra que la fosforilación alterada de Tau, la cual puede generar modificaciones en su funcionamiento, se traduce en una disminución de la viabilidad celular. De hecho, en todas las enfermedades en las cuales la patología de Tau está presente, la proteína se encuentra anormalmente fosforilada. Cabe señalar que la estabilización de los microtúbulos neuronales por Tau, es muy importante para mantener la morfología celular y permitir el transporte de vesículas y organelos (Alonso, et. al.,1994).

La fosforilación de Tau, tiene lugar principalmente en la región rica en prolinas y en la región C-terminal (GSK3 β y CDK5), aunque también existen la fosforilación en la región de unión a microtúbulos (PKA, CaM cinasa II y PKC) (Correas, et. al., 1992; Morishima & Kosik, 1996).

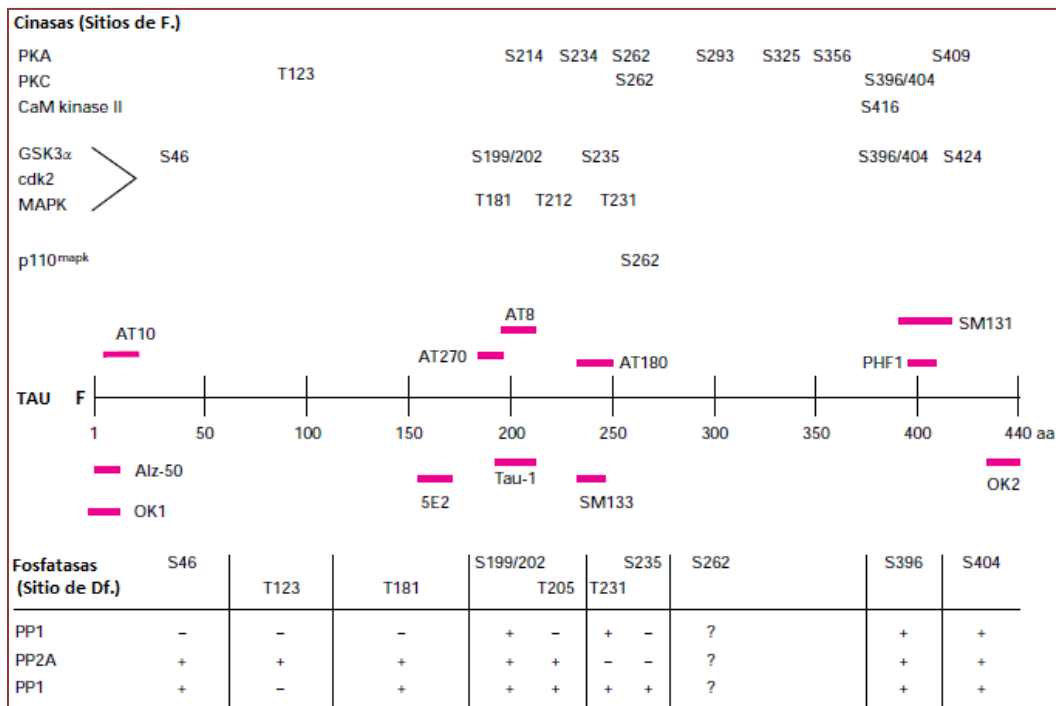


Fig. 12 Sitios de fosforilación/defosforilación de Tau. En la parte superior izquierda, se encuentran las principales cinasas que actúan sobre la proteína, a su derecha aparece los sitios de fosforilación a lo largo de la proteína. En la parte inferior izq., aparecen algunas fosfatasas que desfosforilan a la proteína en los sitios indicados. Las rayas color rosa indican los sitios donde los anticuerpos monoclonales reconocen a la proteína fosforilada (Billingsley & Kincaid, 1997).

Las principales fosfatasas involucradas en el proceso de desfosforilación de Tau son PP1, PP2A y PP5. En condiciones patológicas se infiere que existe un desbalance en el patrón de fosforilación/defosforilación de la proteína. Esto genera que la proteína Tau, que normalmente se encuentra fosforilada en su dominio de proyección con aproximadamente 3 moles de fosfato, se hiperfosforile hasta adquirir 10 moles de fosfato (Alonso, et. al. 2009); provocando un cambio conformacional que la hace susceptible de alcanzar una estructura β plegada (Fig. 13).

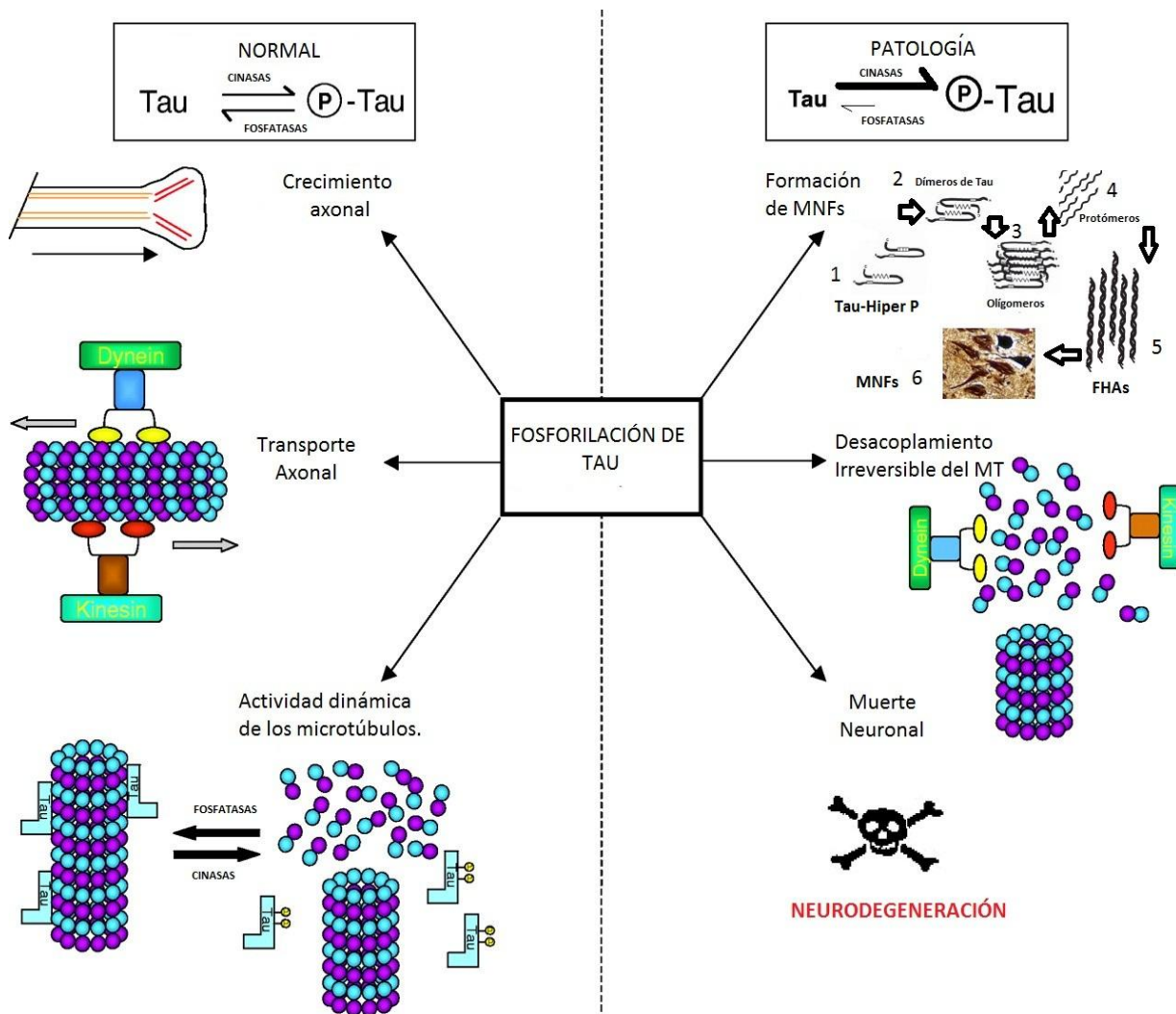


Fig. 13 Comparación de la fosforilación normal y patológica de Tau. Del lado izquierdo se relacionan las funciones de los MTs cuando existe un equilibrio en los procesos de fosforilación/defosforilación de la proteína Tau, siendo esencial para el dinamismo del microtúbulo. En condiciones patológicas se observa que el equilibrio se rompe, desplazándose hacia la hiperfosforilación de la proteína Tau, produciendo un cambio conformacional de la estructura de la proteína a tipo β , que conduce a que la proteína pueda ensamblarse hasta formar los FHAS, presentes de las MNF, que se acumulan en el soma de la neurona produciendo su muerte (Modificado de Johnson & Stoothoff, 2004).

El dímero formado al asociarse dos proteínas Tau hiperforforiladas, tiene la capacidad de secuestrar más proteínas Tau, formando oligómeros; la unión de varios de estos generan protómeros y posteriormente, Filamentos Helicoidales Apareados (FHAs) (Fig. 14), que son las unidades estructurales básicas de las MNF (Meraz-Ríos, et. al., 2010).

Las MNF (Fig. 15) son agregados que se forman en la región perinuclear del cuerpo neuronal, que junto con los fenómenos de toxicidad de los agregados del péptido β A, conllevan a la pérdida de los circuitos sinápticos neuronales (Selkoe, 2001).

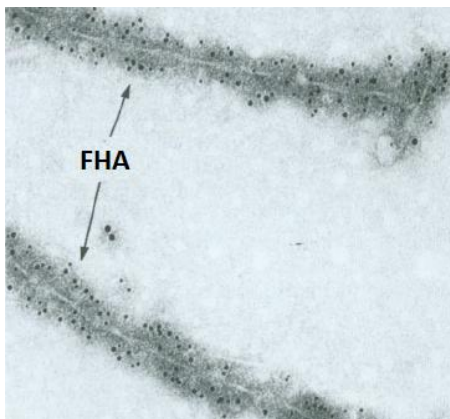


Fig. 14 Filamento Helicoidal Apareado. Microscopía electrónica de FHAs tratados con un anticuerpo anti-FHA llamado mAb-42, con pronasa y anticuerpo anti-tau. (Wischik, et. al., 1988).

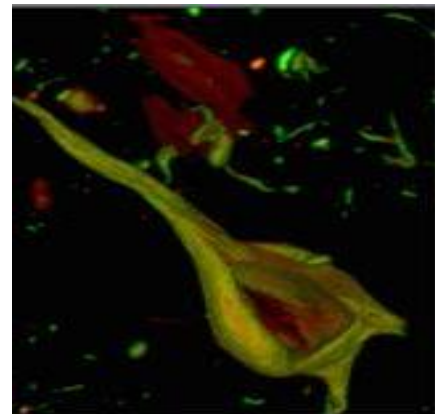


Fig. 15 Maraña neurofibrilar. (Mena, et. al., 2003).

Tras la muerte de una neurona, los agregados Tau se liberan al espacio extracelular, donde activan a la microglia, como lo hacen las PN, y de esta forma se agilizan los procesos neurodegenerativos (Morales, et. al, 2010).

La agregación de la proteína Tau, se manifiesta en otras enfermedades neurodegenerativas conocidas como tauopatías; algunas de ellas son: Parálisis Supranuclear Progresiva, demencia acompañada de parkinsonismo y la demencia frontotemporal ligada al cromosoma 17. Dichas enfermedades pueden originarse por la presencia de mutaciones en

el gen de la proteína Tau; las cuales no están presentes en la EA. Otra característica importante, que diferencia a la EA de las demás enfermedades neurodegenerativas es la presencia de PN (Buee, et. al., 2000).

En la EA, las MNF aparecen primero en la región transentorrinal y la capa II de la corteza entorrinal; las cuales se localizan en la circunvolución del parahipocampo, del lóbulo temporal. Este daño es crítico, puesto que las células neuronales de la capa II de la corteza entorrinal son las responsables de la conexión sináptica de la neocorteza y el hipocampo. Por lo tanto la constante destrucción de esta región, genera una desconexión completa con las áreas asociativas de la neocorteza, constituyendo así la pérdida de la memoria y el aprendizaje, observados conforme avanza la enfermedad.

El número de MNF observadas en la histología post-mortem de casos de Alzheimer, correlaciona con la severidad y duración de la demencia (Braak & Braak, 1991), pero no así, con la neurotoxicidad. Este supuesto se deriva de estudios realizados en modelos transgénicos para la proteína Tau en ratones (Oddo, et. al., 2003) y *Drosophila* (Wittmann, et. al., 2001); en los cuales, descubrieron que la pérdida de la memoria y la neurodegeneración progresiva, se presentaban antes de la aparición de las MNF.

Por otro lado, también se ha descrito que la agregación de la proteína Tau, modula la toxicidad del péptido A β . Lo anterior se derivó de un estudio realizado en un ratón knockout para el gen de tau, del cual se obtuvo un cultivo de neuronas hipocampales y se expusieron al péptido A β . Los resultados demostraron que ante la ausencia de la proteína Tau no se observó neurotoxicidad inducida por el péptido A β ; mientras que cultivos neuronales si expresaban a la proteína tau, la toxicidad de amiloide ocurría de manera constante (Rapoport, et. al., 2002; Ittner & Götz, 2011).

Esto podría explicarse considerando que la proteína Tau tiene la capacidad de interactuar mediante su extremo N-terminal con una tirosin cinasa de membrana plasmática llamada Fyn; la cual, fosforila la subunidad 2 de los receptores a NMDA, como consecuencia, estos

se estabilizan por la unión con la proteína post-sináptica PSD95, lo cual facilita la excitotoxicidad promovida por los agregados de A β (Haass & Mandelkow, 2010).

Además de las formas hiperfosforiladas de la proteína Tau, los estudios histopatológicos post mortem sobre la presencia de las MNF, han evidenciado la presencia de formas truncadas en el extremo carboxilo terminal; las más comunes son Asp421 y Glu391. Estas se han encontrado sólo en los cerebros de pacientes con EA y correlacionan con la progresión de la enfermedad. Actualmente se sabe que la truncación de Tau, se lleva a cabo después de su hiperfosforilación y antes de la formación de las MNF. Debido a que estas formas truncadas e hiperfosforiladas se encuentran mayoritariamente en los FHA (Ludovic, et. al., 2011), se ha propuesto que dichas modificaciones contribuyen a la agregación de la proteína (Campos-Peña, et. al. 2009). También se ha demostrado que la truncación requiere de una previa desfosforilación de Tau en sitios cercanos a los que serán escindidos, permitiendo así el acceso de las caspasas 3, 6, 7 y 9, que son las responsables de generar parte de su truncación (Mondragón-Rodríguez, et. al., 2008). Por tal motivo, se ha ligado a la truncación como un evento que incrementa la apoptosis neuronal. Un estudio reciente reveló que al menos la forma truncada de Tau en el Asp 421 junto con el A β contribuyen a la disfunción mitocondrial observada en la EA (Quintanilla, et. al., 2011).

5.7 GSK3 β , principal cinasa que fosforila a Tau y su relación con la EA.

El cerebro consume de 18 a 30% de glucosa, por tal motivo el metabolismo de la Glucosa juega un papel importante en el SNC. La cinasa-3 de la Glucógeno sintasa (GSK3), fosforila y activa a la Glucógeno sintasa, última enzima en la biosíntesis de glucógeno (fuente de reserva energética). GSK3 tiene dos isoformas, GSK3 α y GSK3 β ; están codificadas por el cromosoma 19 y 3 respectivamente, y guardan un 98% de similitud en su dominio catalítico. En el SNC, están distribuidas ampliamente, aunque GSK3 β se encuentra principalmente en los axones y es una de las principales cinasas que fosforila a la proteína Tau, permitiendo su separación del MT neuronal, alterando la modulación del transporte axonal (Muyllaert, et. al., 2008) y conduciéndola a la neurodegeneración.

GSK3 puede ser inhibida por factores de crecimiento y por insulina, mediante la activación de la vía de fosfatidil inositol (PI), y la posterior activación de la protein cinasa B (PKB o Akt), que fosforila a GSK3 (Ser 21 para GSK3 α y Ser 9 para GSK3 β) bloqueando la interacción de esta cinasa con el grupo fosfato de sus sustratos correspondientes. Los factores de crecimiento también pueden inhibir a GSK3 mediante la activación de cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Frame & Cohen, 2001) .

A lo largo de los años, se ha planteado una posible relación entre la Diabetes Tipo 2 (DMT2) y el desarrollo de EA. A este respecto se sabe que el 80% de pacientes con EA comparten con pacientes DMT2, una desregulación en el metabolismo de la glucosa, un aumento de estrés oxidante, resistencia a la insulina y amiloidogénesis. Como resultado de la hiperinsulinemia, el receptor de insulina se altera, modificándose la vía de PI/Akt, impidiendo la inactivación de GSK3 α . Esta cinasa, interacciona con la Presenilina-1 del complejo multiproteico γ -secretasa, incrementando la actividad enzimática del complejo y por lo tanto favoreciendo la producción del péptido A β . Por otro lado, la alteración de la vía PI/Akt en la EA, promueve también un aumento de la actividad de la cinasa GSK3 β , lo cual podría favorecer la hiperfosforilación de la proteína Tau y por consiguiente, la formación de MNF (Zhao & Townsend, 2009; Pei, et. al., 2003).

Otra vía de señalización que regula la actividad de GSK3 es la de Wnt/ β -catenina. Se activa por ligandos Wnt, los cuales se unen a receptores de 7 α -hélices transmembranales llamados Frizzled (Fz) y al receptor de lipoproteínas de baja densidad 5 y 6 (LPR5/6), quienes reclutan a la fosfoproteína Dishevelled (Dvl) y a la Axina. Esta última es fosforilada y, no puede asociarse con la proteína supresora de pólipos adenomatosos de colón (APC) y la cinasa GSK3 β ; lo cual permite que la β -catenina quede libre en el citoplasma y pueda translocarse al núcleo, donde activará al Factor de transcripción de células T (TCF) y al Factor estimulador linfóide (LEF), para promover funciones de adhesión, proliferación y migración celular. En ausencia de ligandos Wnt, se forma el complejo mencionado y GSK3 β fosforila a la β -catenina, promoviendo así su ubiquitinación y degradación vía proteosoma (Frame & Cohen, 2001; Mc Donald, et. al., 2009).

El A β puede interactuar con los receptores Fz mediante un residuo rico en cisteínas y ser antagonista de ligandos Wnt. De esta forma puede inhibir la vía de señalización Wnt y sus funciones previamente descritas (Fig. 16). También se cree que el A β , puede promover un incremento de la actividad de GSK3 β y una mayor degradación de la β -catenina.

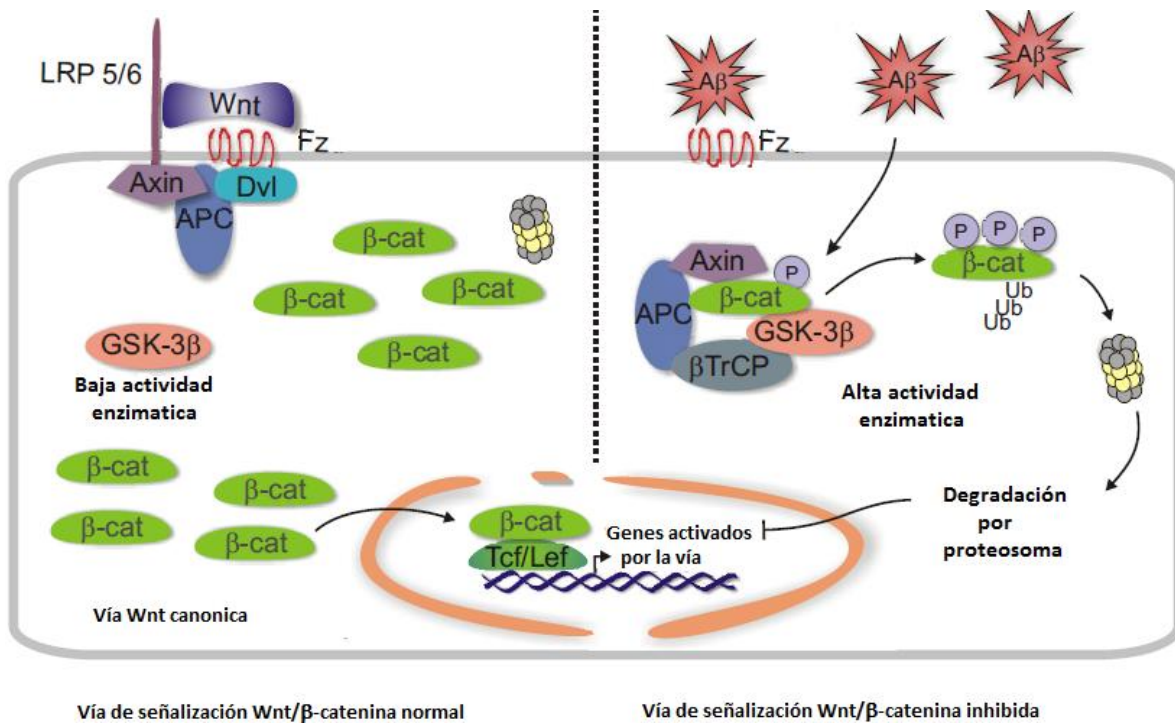


Fig. 16 Vía Wnt/ β -catenina y su inhibición por A β . En el panel izquierdo se muestra la activación de la vía canónica de la Wnt/ β -catenina, mediante la interacción de ligandos Wnt con receptores Frizzled y LRP 5/6, lo cual genera que la β -catenina citoplasmática se transloque al núcleo para activar la transcripción de genes, que favorezcan funciones de adhesión, migración y diferenciación celular. El péptido A β , puede interactuar con los receptores Fz e inhibir la vía Wnt, promoviendo un incremento en la actividad de GSK3 β , quien fosforila a la β -catenina, impide su translocación al núcleo y promueve su degradación vía proteosoma (Modificado de Inestrosa & Toledo, 2008)

Lo anterior contrasta con estudios post mortem, realizados en cerebros de pacientes con EA; en donde se ha encontrado un incremento en la actividad de GSK3 β , el aumento de niveles de β -catenina fosforilada y, una disminución en los procesos de neurogénesis y plasticidad neuronal en la zona subgranular del giro dentado en el hipocampo. El incremento de actividad de la GSK3 β , debido a la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina, desencadenada por

el péptido A β , podría favorecer la hiperfosforilación de la proteína Tau. (Khan & Berti, 2009; He & Shen, 2009; Magdesian, et. al., 2008; Inestrosa & Toledo, 2008).

En el caso particular de la EA, se ha descrito que existe una sobreactivación de GSK3 β y se ha sugerido que este evento induce la formación de las MNF. Estudios post mortem realizados en cerebros de pacientes, revelan la localización de GSK3 β en las MNF y en neuronas piramidales de la zona hipocampal (40-80% de colocalización) (Pei, 1997; Pei, 1999). De igual manera, ratones transgénicos que sobreexpresan la cinasa, muestran un aumento en los niveles de Tau hiperfosforilada, aparición de agregados fibrilares de la proteína, así como cambios en la memoria y el aprendizaje (Hooper, et. al., 2008; Hernández, et. al., 2009; Hernández, et. al., 2010).

Otra implicación de la cinasa en la EA es la modulación de la vía intrínseca de la apoptosis celular. El péptido A β , promueve la generación y acumulación de ROS en la mitocondria, lo cual puede favorecer la activación de proteínas proapoptóticas; una de ellas es Bax (miembro de la familia Bcl-2). Un estudio reveló que GSK3 β fosforila a Bax en su residuo Ser-163; al activarse esa proteína permite la generación del poro de transición mitocondrial y la subsecuente liberación del citocromo c. Normalmente, este fenómeno se compensa con la activación de proteínas antiapoptóticas, pero tomando en cuenta que en la EA, existe una sobreactivación de GSK3 β , se favorecen los fenómenos apoptóticos. Bajo estas condiciones, se inhiben factores de transcripción como es el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF1) que modula la respuesta ante el estrés celular (Mines, et. al., 2011). El uso de inhibidores de la GSK3 β en cultivo celulares expuestos al péptido A β , disminuye la hiperfosforilación de la proteína Tau y la muerte celular (Takashima, et. al., 1993; Takashima, et. al., 1998).

Estudios recientes han demostrado que GSK3 β , se relaciona con la pérdida de la memoria y aprendizaje que sufren los pacientes con EA, debido a que se ha descrito que la sobre activación y/o sobreexpresión de la cinasa, disminuye la LTP e incrementa la LTD, a través de la modulación de receptores NMDA (Peineau, et. al., 2007; Salcedo-Tello, et. al., 2011). La potenciación a largo plazo (LTP), es un incremento en la transmisión sináptica y

respuesta post-sináptica, derivada de una estimulación sostenida, de alta frecuencia y en periodos cortos de tiempo; la eficiencia sináptica es disminuida por la depresión a largo plazo (LTD). La LTP contribuye a la capacidad de memoria y, se lleva a cabo en áreas de corteza entorrinal e hipocampo.

5.8 Degradación de la proteína Tau patológica.

Ante la agregación de la proteína Tau, se activan principalmente dos mecanismos celulares de degradación. Estos son la autofagia mediada por lisosomas y el proteosoma vía ubiquitinación (Wang, et. al., 2009).

Cuando la proteína Tau se hiperfosforila, adquiere un cambio conformacional, que activa respuestas celulares ante estrés, mediadas por las proteínas de choque térmico (HSPs). La función de estas proteínas es reconocer el plegamiento erróneo de la proteína y dirigir su replegamiento y/o degradación (Sahara, et. al., 2007). Las principales proteínas que se activan son la HSP70 y HSP90. Estas proteínas forman un complejo para estabilizar a la proteína blanco en cuestión; tienen un dominio con actividad de ATPasa, mediante el cual modulan su unión a diferentes proteínas. El complejo es modulado principalmente por la proteína Hop (Brehmer, et.al., 2001, Pearl & Prodromou, 2006).

Para el replegamiento de Tau, se reclutan a fosfatasas como la PP5 y la Prolil isomerasa Pin1, las cuales actúan sobre sitios de fosforilación de las cinasas GSK3 β y CDK5 (Gong, et. al., 2004; Liou, et. al., 2003).

Cuando la proteína se ha desfosforilado, chaperonas regulan la hidrólisis de ATP para liberar a la proteína replegada (Pearl, et. al., 2008). Se han realizado estudios en modelos experimentales donde, el incremento en los niveles de HSP70 y HSP90; y la inhibición de la actividad de ATPasa, promueve la solubilidad de la proteína Tau y su unión a los microtúbulos neuronales (Jinwal, et. al., 2010).

En caso de que Tau, no recupere su conformación nativa, existen algunas ubiquitin ligasas que se unen a las HSPs, reconocen ciertos residuos hiperfosforilados de Tau y adicionan poliresiduos de ubiquitina. La principal ubiquitin ligasa de Tau, es la Proteína CHIP; la cual se une al complejo formado por HSP70, HSP40, HSP90 y Hop, que previamente reconoce a Tau hiperfosforilada. La primera interacción se da con la HSP70 mediante el dominio de tetratricopéptido de la chaperona, generando que esta se inactive y se separe del complejo (Petrucci, et.al., 2004; Salminen, et. al., 2011). De esta forma, CHIP, puede añadir a la proteína los residuos de ubiquitina. Esta modificación postraduccional, puede dar lugar a la formación de nuevos agregados de Tau, como una forma de reducir la toxicidad que desencadena la proteína en su forma hiperfosforilada soluble (Wang & Liu, 2008); o bien, ser reconocida como una señal de degradación por el complejo del Proteosoma (Goryunov & Liem, 2007) (Fig. 17).

El proteosoma 26S, es un sistema de degradación proteolítica dependiente de ATP. Está conformado por tres subunidades proteicas: dos 19S, que se encargan de reconocer por lo menos 4 residuos de ubiquitina de la proteína a degradarse y tiene función de ATPasa; la otra subunidad es el core proteolítico 20S, en donde finalmente se degrada la proteína Tau (David, et. al., 2002; Yen, 2011). Aunque la mayoría de estudios apuntan a que la proteína Tau ubiquitinada es degradada mediante el complejo del proteosoma completo, recientemente se realizó un estudio in vitro con cultivos celulares donde se demostró que la degradación de Tau, podría darse de forma independiente de ATP y ubiquitinación, con sólo poseer el core 20S del proteosoma (Grune, et. al., 2010).

En la EA, se ha visto que la actividad de las HSP, CHIP, y la degradación por proteosoma no son eficientes. Estas respuestas son inhibidas por la presencia de oligómeros del péptido A β y por formas fibrilares de Tau, las cuales incrementan proporcionalmente con el tiempo de evolución de los pacientes (Salminen, et. al., 2011). A este respecto, actualmente se ha estudiado la vía de señalización de Akt, ya que se piensa que modula la actividad del complejo CHIP/HSP90. Por otro lado, en la enfermedad esta vía está alterada, de tal forma que inhibe el complejo mencionado y por el contrario induce una mayor fosforilación de Tau mediante la activación de GSK3 β (Dickey, et. al., 2008).

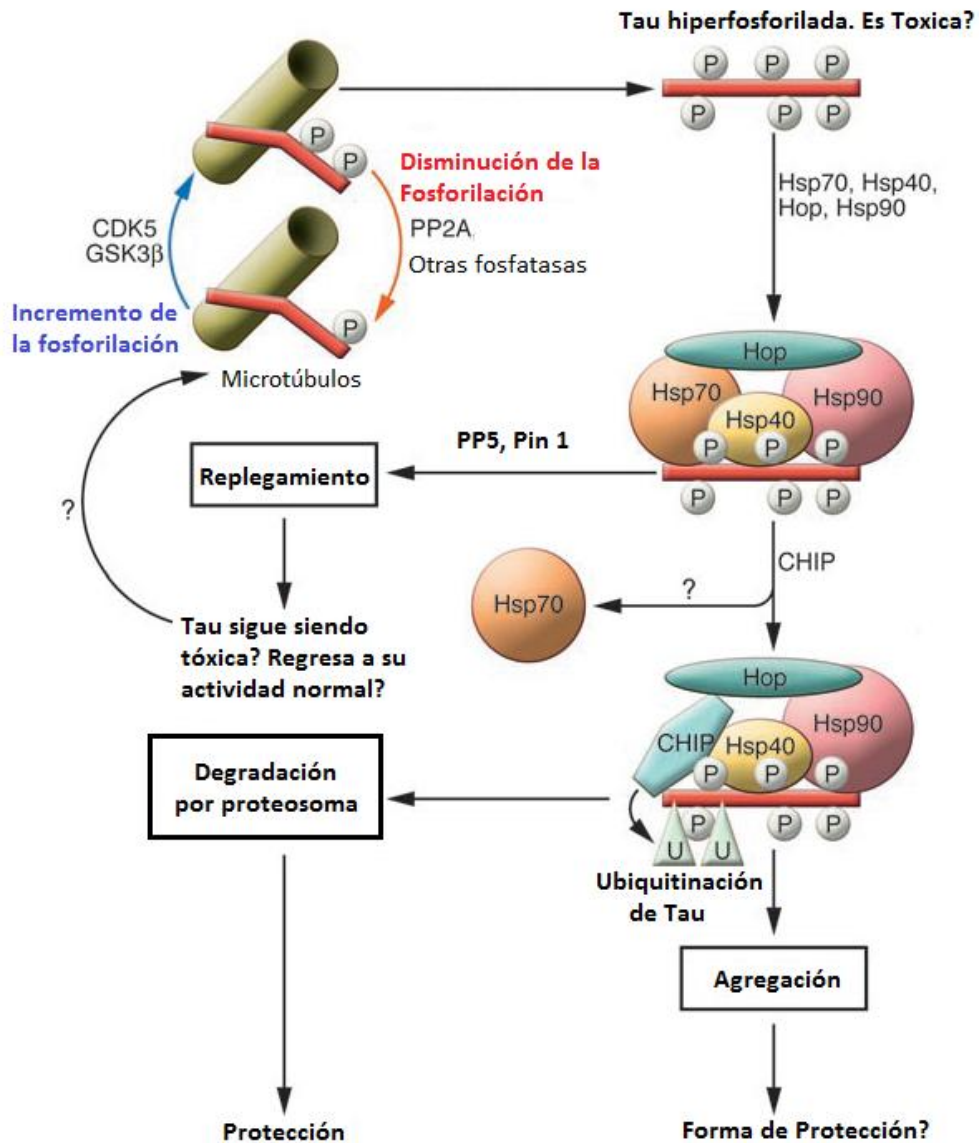


Fig. 17 Hipótesis de degradación de la proteína Tau patológica. Como resultado de un desbalance entre los patrones de fosforilación/desfosforilación de la proteína Tau, se hiperfosforila y sufre un cambio conformacional proagregatorio. Se ha propuesto que esta forma es tóxica y que activa la respuesta ante estrés mediada por un complejo de proteínas de choque térmico HSP70, HSP40, HSP90 y la cochaperona Hop, quienes llevan a cabo la estabilización de la proteína y tratan de regresarla a su estado nativo. Para ello se apoyan de fosfatasas como PP5 y Pin 1. En caso de que esta respuesta no sea exitosa, la proteína CHIP, se une al complejo de chaperonas, desplaza a la HSP70 y adiciona poliresiduos de ubiquitina a Tau, formándose agregados, que podrían ser menos tóxicos, que la proteína en estado de hiperfosforilación; también puede ser una señal reconocida por el proteosoma para la degradación de la proteína (Modificado de Goryunov & Liem, 2007).

5.9 Estudios de asociación genética relacionados con la EA de tipo esporádico.

Previamente se mencionó que la mayoría de los casos con EA, corresponden al tipo esporádico, cuyo origen es multifactorial (Kamboh, 2004). Tomando en cuenta que la EA de tipo familiar está determinada genéticamente, se ha tratado de identificar, cuál es la carga genética que pudiera contribuir al desarrollo de la enfermedad de tipo esporádico.

Para tal efecto, se han utilizado como herramienta estudios de asociación genética, los cuales determinan la posible relación estadística entre variables genéticas poblacionales y fenotipos determinados. Algunos toman en cuenta otros factores (ambientales y nutricionales) que pudieran contribuir al riesgo de desarrollar cierta enfermedad (Sevilla, 2007).

Las variables genéticas más comunes que se analizan en los estudios de asociación, son del tipo polimórficas, las cuales representan el 1% del genoma humano (aproximadamente 12 millones de pares de bases); estimándose que existe un cambio por cada 1000-3000 pb. Tales variantes, se pueden agrupar en tres grandes grupos: polimorfismos por deleciones e inserciones de fragmentos cortos, polimorfismos de variación en el número de copias y polimorfismos de cambio de un solo nucleótido (SNP). Este último grupo, es uno de los más recurrentes en los estudios de asociación (Iniasta, et. al., 2005; Attia, et. al., 2009).

Un SNP, es el cambio de una base en la secuencia de ADN, presente en más del 1% de la población (Vignal, et. al, 2002). Los SNPs no contienen la fuerza necesaria para la inducción de una enfermedad, pero sí producen un incremento del riesgo a los individuos portadores cuando se compara con la población no portadora, por lo cual podrían ser usados como marcadores de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad (St. George, et. al., 1990). Se ha reportado que las variantes alélicas, pueden dar lugar a la modificación de los niveles de expresión de los genes o a variaciones funcionales de las proteínas (Hoenicka, 2006).

Para que un estudio de asociación genética de SNPs, aporte información que pudiera ligarse al desarrollo de una enfermedad, se recurre frecuentemente a un análisis de casos y controles. Para ello, se identifica un grupo de casos diagnosticados clínicamente con la enfermedad y otro de individuos no afectados en la misma población; a los cuales se determinan la frecuencia de distribución de las variantes genéticas que presentan para determinado polimorfismo. Con estos datos, se obtiene como mínimo la siguiente información, que permite una comparación estadística entre casos y controles (Cordell & Clayton, 2005; Bird, et. al.; 2001):

- Frecuencias alélicas: Proporción con la cual aparece un alelo (forma alternativa de un gen), en un determinado locus génico, en una población dada.
- Frecuencias genotípicas: Proporción de las posibles combinaciones de alelos de un locus génico. En el caso de los SNP, se pueden obtener tres resultados; homocigoto para un alelo, heterocigoto y homocigoto para el otro alelo.
- Frecuencias Haplotípicas y/o combinaciones multiloci: Proporción de una combinación de múltiples alelos que se encuentren (haplotipos) o no en un mismo gen (combinación multiloci).

Además deberá evaluarse el Equilibrio de Hardy-Weingberg (EQHW) y el Desequilibrio de Ligamiento (LD).

El EQHW, es una forma de evaluar las características genotípicas de la población y detectar errores en la genotipificación. Debido a que realiza un análisis de las frecuencias genotípicas obtenidas en el estudio y las compara con las esperadas para el EQHW. Este equilibrio considera que las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación siempre y cuando: no exista traslape de generaciones, los apareamientos se den al azar (panmixia), la población sea infinita, no aparezcan mutaciones, no existan migraciones ni selección natural (Attia, et. al, 2009).

El análisis LD es un recurso para identificar genes con una posible asociación causal con el fenotipo de interés. Evalúa si ciertos loci (posiciones en un cromosoma) no son heredados de manera independiente durante un evento meiótico, si no que pasan a la progenie en

bloques. Lo cual podría ligarse al riesgo y/o susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades complejas (Lunetta, 2008; Slatkin, 2008).

Si en la comparación estadística de las frecuencias alélicas entre los casos y los controles, se encontrara un alelo de posible susceptibilidad, se debe de tomar en cuenta 3 posibilidades, que (Wyszynsk, 1998; Cardon & Bell, 2001):

- El alelo este realmente relacionado con el fenotipo de la enfermedad.
- El alelo no sea responsable del fenotipo, pero se encuentre en desequilibrio de ligamiento con el alelo de otro SNP que si lo genere. Por lo que puede actuar como marcador de susceptibilidad para el desarrollo de la Enfermedad.
- La variante encontrada sea propia de un grupo derivado de una mezcla poblacional o estrato genético de la población analizada. Por lo cual, es necesario realizar un estudio de subestructuración poblacional, identificar las variantes propias de cada grupo y descartar asociaciones falsas.

Una característica importante para la validez de los estudios de asociación genética es la replicación de los resultados. Lo cual consiste en el hecho que, las variantes encontradas como asociadas a una enfermedad en determinada población, deberán ser las mismas cuando se aumente el número de casos y controles. De lo contrario, es necesario considerar las posibilidades que se explicaron anteriormente (Ioannidis, et. al, 2001).

El primer estudio de asociación genética en casos y controles, válido para la EA de tipo esporádico, se realizó mediante la determinación de los alelos del gen de la Apolipoproteína E. Dicha proteína está implicada en la movilización y redistribución del colesterol durante el crecimiento neuronal y después de alguna lesión (Mahley, 1988). También participa en procesos como la regeneración nerviosa, inmunoregulación y en la activación de algunas enzimas lipolíticas (Mahley, et al., 2000). La determinación de sus alelos, ha revelado que el alelo ϵ_4 , es un factor que confiere susceptibilidad genética para desarrollar la EA. Se ha reportado que el riesgo de padecer la enfermedad de tipo esporádico, aumenta de un 20 a 90% y la media de edad de inicio de la EA disminuye de 84 a 68 años cuando hay dos alelos ϵ_4 (Corder, et al., 1993; Romas et. al., 2002). Estudios realizados in vitro, han

concluido que, la isoforma $\epsilon 4$ de ApoE, se une al péptido A β con mayor rapidez, lo cual podría contribuir a la formación PN (Strittmatter, et al., 1993). Sin embargo, la asociación genética de $\epsilon 4$, no se ha replicado en diversas poblaciones incluyendo a la mexicana, donde la frecuencia reportada para dicho alelo en nuestra población es muy baja (Villalpando-Berumen, et. al., 2008).

Se han realizado otros estudios de asociación genética de SNP entre casos y controles, los cuales se enfocan en genes de proteínas que tienen una relación directa e indirecta en la fisiopatología de la enfermedad. Tal es el caso de la proteína Tau, cuya importancia fue recalcada anteriormente.

Con base a lo anterior, existen en la literatura diversos estudios que tratan de relacionar la presencia de una variante polimórfica con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. En este sentido, en el año 2005 Myers y colaboradores, realizaron un estudio sobre la relación que existe entre la presencia de ciertos SNP (Myers, et. al., 2005) localizados en el gen de Tau, con el desarrollo de la EA en una población estadounidense y del reino unido. Los resultados obtenidos del análisis de locus simple, permitieron determinar que el alelo G en el polimorfismo rs242557 (región 5' del exón 1), el alelo C en el polimorfismo rs2471738 (intrón 9) y el alelo G en el polimorfismo rs3785885 (Intrón 3), representaban un factor de riesgo para el desarrollo de esta patología.

De la misma manera, el gen de la cinasa GSK3 β , localizado en el cromosoma 3q13.3. Ha sido estudiado, debido a su papel fundamental en el proceso de fosforilación “anormal” de la proteína Tau. Un estudio de asociación genética de casos y controles, realizado en una cohorte de pacientes del Reino Unido y otra Australiana, reveló que la presencia del alelo T en los SNP, rs334558 y rs6438552, presentes en el gen de GSK3 β , podrían conferir susceptibilidad genética para el desarrollo de la EA (Kwok, et. al., 2008). También observaron que esto concordaba con un estudio previo realizado en población Española (Mateo, et. al., 2006). En el estudio de las cohortes mencionadas, se realizaron además la determinación del haplotipo H1 estudiado por Myers, observándose que en población

caucásica del Reino Unido, la presencia de este haplotipo y alelos T de polimorfismos en GSK3 β , incrementaban el riesgo a desarrollar EA (Kwok, et. al., 2008).

El gen de la proteína HSP70 isoforma 1, se encuentra en la región con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad III, en un clúster con dos genes que codifican para las isoformas de las HSP en el cromosoma 6; existe un estudio de asociación genética de casos y controles, en población sajona en el que no encuentran relación de variantes de este polimorfismo y el riesgo de desarrollar EA (Lehmann, et. al., 2001). Sin embargo, al ser el único estudio reportado y debido a la importancia de dicha proteína en la degradación de Tau, es importante realizar nuevos estudios de asociación.

Otra proteína de choque térmico con una función protectora en la EA, es la proteína HSP70 isoforma 5. Se activa por estrés del retículo endoplásmico y en plegamiento erróneo de proteínas; por lo que tiene la capacidad de unirse a la PPA- β y disminuir la producción del péptido A β (Yang, et. al., 1998). En el 2008, se realizó un estudio de asociación genética de casos y controles, en población Taiwanesa de tres SNPs (rs391957, rs17840761 y rs3216733) en busca de una posible relación con la EA, descubriéndose que en dicha población, la presencia del alelo G en el rs391957 y una delección en el rs3216733, promovían cierta susceptibilidad a desarrollar la enfermedad (Hsu, et. al, 2008).

VI. JUSTIFICACIÓN

En México, no se tienen datos epidemiológicos oficiales que reflejen la incidencia de la Enfermedad de Alzheimer en nuestra población. Sin embargo, debido a que la prevalencia e impacto económico-social a nivel mundial, de esta patología es muy elevada, es necesario implementar estudios que identifiquen marcadores moleculares tempranos de la Enfermedad. Todo esto con la finalidad de proponer medidas preventivas y brindar un mejor manejo a los pacientes y familiares.

En este sentido, los estudios de asociación genética de casos y controles, han evidenciado la existencia de variantes polimórficas en genes de proteínas, que podrían interpretarse como factores de susceptibilidad genética que contribuye al desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico. Estos resultados no se replican en todas las poblaciones, lo cual hace pensar la importancia de factores geográficos y ambientales en la expresión fenotípica de la enfermedad. Por tal efecto y para validar los datos obtenidos, es necesario que los estudios de asociación genética se realicen en cada población, tomando en cuenta su mezcla genética.

Como parte de estos esfuerzos, en el laboratorio se han realizado estudios de asociación genética entre casos y controles, que incluyen la identificación de polimorfismos de cambio de un solo nucleótido (SNP) en los genes de proteínas involucradas en el procesamiento de la Proteína Precursora del Péptido Amiloide. Como ya se ha descrito, la formación de Placas Neuríticas, es uno de los marcadores histopatológicos que caracterizan a la EA. Hasta el momento, el análisis ha revelado la presencia de variantes alélicas que pudieran ser posibles marcadores de susceptibilidad genética, para el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico en nuestra población.

Por otro lado, si bien la presencia de PN es un factor que define la EA, la presencia de Marañas Neurofibrilares, es sin duda el rasgo característico que correlaciona con el grado de demencia de los pacientes. Como sabemos, las MNF están formadas por agregados

fibrilares de la proteína Tau, en estado hiperfosforilado y la existencia de alteraciones en el procesamiento de la proteína, como la fosforilación y degradación, pueden ser el factor desencadenante de la patología.

En la actualidad se han descritos en la literatura, estudios de asociación genética en casos y controles que pretenden identificar si la presencia de ciertos SNP localizados en el gen de la proteína Tau, GSK3 β y Proteínas de Choque Térmico; pudieran estar asociados con el desarrollo de la EA de tipo esporádico. Los resultados obtenidos demuestran que, se ha relacionado la presencia de SNP en los genes de la proteína Tau y GSK3 β con el desarrollo de la enfermedad en poblaciones Europeas.

Con base en esto y considerando los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, resulta de gran importancia realizar un estudio de asociación genética, con la finalidad de identificar si la presencia de ciertos SNP localizados en los genes de las proteínas mencionadas, están relacionados con el desarrollo de la EA. Los resultados obtenidos contribuirán a determinar un posible perfil genómico en pacientes con Enfermedad de Alzheimer en nuestra población.

VII. OBJETIVOS

General

Realizar un estudio de asociación genética entre casos y controles, evaluando alelos de riesgo en polimorfismos de cambio de un solo nucleótido en los genes de la proteína Tau, así como en los genes de la cinasa GSK3 β , la HSP70-1 y la HSP70-5; mediante discriminación alélica en un grupo de pacientes mexicanos con Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico.

Particulares

-Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas, haplotípicas y de genotipos multiloci, de los polimorfismos estudiados, en un grupo de 50 pacientes de Enfermedad de Alzheimer de Tipo Esporádico y otro de 50 controles pareados por edad.

-Identificar los factores de riesgo genético que pudieran contribuir al desarrollo del fenotipo de la Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico en la muestra estudiada.

-Realizar una comparación de nuestros resultados de frecuencias alélicas y genotípicas, con los obtenidos en estudios realizados en otras poblaciones.

-Evaluar el Equilibrio de Hardy-Weinberg, como una medida comparativa de variabilidad genética entre los grupos estudiados.

-Analizar los patrones de ligamiento de los loci estudiados, en casos y controles, en búsqueda de un patrón de Desequilibrio de Ligamiento que pudiera estar ligado a la Enfermedad de Alzheimer en la población mexicana.

-Determinar la estructura genética de los grupos estudiados, a nivel individual y poblacional, mediante métodos de estadística Bayesiana; para evitar omitir posibles falsos positivos debidos a la estratificación genética de nuestra población.

VIII. HIPÓTESIS

“La combinación específica de variantes alélicas en los genes de la proteína Tau, GSK3 β , HSP70-1 y HSP70-5; favorecerá el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer en la población mexicana”.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Universo de trabajo.

Para llevar a cabo el estudio de asociación genética de casos y controles, se analizaron **50 pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo Esporádico, 50 controles**. También se contempló un grupo de **50 individuos de la población general**, con la finalidad de tomar en cuenta la estratificación genética de la población mexicana.

➤ En el caso de los **pacientes**, se tomaron como criterios de:

Inclusión:

-Clínicamente diagnosticados con la EA de tipo esporádico, mediante evaluaciones neuropsicológicas, historia clínica y estudios de imagen. Los pacientes fueron reclutados en el Hospital Central Militar, Hospital General de México, Instituto de Geriátrica e Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “MVS” (INNN).

-Mayores de 60 años.

-Firma del consentimiento informado del protocolo registrado en el INNN (Ver Anexo I).

-Contar con al menos 3 generaciones de ancestros mexicanos.

Exclusión:

-Pacientes con antecedentes familiares de enfermos con Alzheimer o que no cumplieran con los criterios de inclusión.

➤ Para el grupo **control**, se tomaron como criterios de:

Inclusión:

-Catalogados clínicamente como sanos.

-Mayores de 60 años. Los controles se parearon con los pacientes de acuerdo con su edad.

-Firma del consentimiento informado del protocolo registrado en el INNN.

-Contar con al menos 3 generaciones de ancestros mexicanos.

Exclusión:

-Individuos con características clínicas de alguna demencia senil, con antecedentes familiares de enfermos con Alzheimer u otra demencia y/o que no cumplieran con los criterios de inclusión.

Por último, para los individuos pertenecientes a la **población general**. Los criterios exigidos fueron:

Inclusión:

-Menores de 60 años, sin importar sus antecedentes clínicos, excepto cuando se traten de enfermedades neurodegenerativas.

-Firma del consentimiento informado del protocolo registrado en el INNN.

-Contar con al menos 3 generaciones de ancestros mexicanos.

Exclusión:

-Individuos con características clínicas de alguna demencia, con antecedentes familiares directos de Enfermedad de Alzheimer u otra demencia y/o que no cumplieran con los criterios de inclusión.

A continuación se presenta una tabla con rango de edades y sexo promedio presentado por cada uno de los 3 grupos de estudio incluidos en este proyecto para cada uno de los 3 grupos de estudio (Ver detalles, en los Anexo II, III y IV)

Tabla 2. Datos generales de edad promedio y sexo, presentados en los grupos de estudio incluidos en este proyecto.

	EDAD		SEXO	
	Rango	Promedio	F	M
PACIENTES ALZHEIMER	61-100	81	27	23
CONTROLES	61-100	81	29	21
POBLACION GENERAL	14-53	32	35	15

9.2 Obtención de muestra sanguínea.

De cada individuo incluido en el estudio, se obtuvo una muestra de sangre periférica completa en un tubo de 5 ml con EDTA. La sangre se extrajo mediante una venopunción en las venas cubital, basílica o cefálica, utilizando el sistema Vacutainer.

9.3 Extracción de ADN.

Se ocuparon 2 ml de sangre completa de cada individuo, para realizar la extracción y purificación de ADN genómico, mediante el Kit comercial QIAamp DNA Blood Midi Kit® de QIAGEN (No. de catálogo 51185); de acuerdo a las especificaciones del proveedor (detalles ver Anexo V).

9.4 Cuantificación y Verificación de integridad de ADN.

Al finalizar la extracción del ADN, se llevó a cabo la cuantificación de 1 µl de cada muestra, utilizando el espectrofotómetro de UV/Vis para microvolúmenes modelo ASP-3700® de la compañía ACTGene, el cual analiza la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} . El ADN cuantificado, fue diluido en alícuotas de 10 ng/µl y se guardaron en congelación (-20°C) hasta su uso.

La integridad del ADN, se verificó mediante una electroforesis en gel de Agarosa al 0.8 %. (Grado Biología Molecular, de la marca IBI®) Para la visualización de los ácidos nucleicos, se añadió a la Agarosa, 1 µl de Bromuro de Etidio. El corrimiento electroforético

se llevó a cabo a 100V, durante 15 min, en la cámara horizontal Mini Run GE-100® de la compañía BIOER. La visualización del resultado se llevó a cabo en un trans-iluminador con luz UV, acoplado a un sistema de Fotodocumentación MiniBIS-Pro® de DNR Bio-Imaging Systems.

9.5 Selección de SNP y diseño de sondas TaqMan.

Se realizó una selección de 9 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), presentes en el gen de la proteína Tau (MAPT), GSK3 β y HSP, con la finalidad de conjuntar aspectos relacionados con la fosforilación y degradación de la proteína Tau. Los distintos SNPs, se obtuvieron de base de datos del Alzforum (<http://www.alzgene.org>); en donde se reportan los estudios de asociación genética de la EA, realizados en diversas poblaciones.

El criterio para la selección de los polimorfismos de estudio, se basó en aquellos que en más de la mitad del total de artículos publicados, contaran con una asociación positiva con el desarrollo de la enfermedad. Del total de SNP seleccionados, 5 se encuentran localizados en el gen de la proteína Tau, 2 en el gen de la cinasa GSK3 β , 1 SNP en el gen de la HSP70-1 y otro en el gen de la HSP70-5 (Tabla 3).

Tabla 3. Polimorfismos de Cambio de un solo Nucleótido (SNP) seleccionados para nuestro estudio de asociación genética. (Datos tomados de <http://www.alzgene.org> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

POLIMORFISMO	REGIÓN	CÓDIGO	CROMOSOMA	POSICIÓN EN CROMOSOMA	ALELO ANCESTRAL (VIC)	ALELO POLIMORFICO (FAM)
rs242557	5' del exón 1	MAPT 1	17	41375548	A	G
rs1467967	5' del exón 1	MAPT 2	17	41342006	A	G
rs2471738	Intrón 9	MAPT 3	17	41431900	C	T
rs7521	3' of exón 14	MAPT 4	17	41461242	A	G
rs3785883	Intrón 3	MAPT 5	17	41410268	A	G
rs2227956	Exón 2	HSP701	6	31778272	C	T
rs391957	5' UTR	HSP705	9	128004024	C	T
rs334558	5' UTR (-50)	GS1	3	119813282	A	G
rs6438552	Intrón 5	GS2	3	119631814	A	G

La determinación de cada SNP se realizó, mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real, basada en la tecnología de sondas TaqMan® de Applied Biosystems.

A diferencia de la PCR convencional de tiempo final, la PCR en Tiempo Real permite realizar la detección del producto amplificado o amplicón y al mismo tiempo llevar a cabo su cuantificación por ciclo. La PCR Tiempo Real con sondas TaqMan®, es un ejemplo donde se utiliza un método de fluorescencia directa, debido a que, además del juego de primers, incluye un fragmento corto de oligonucleótidos, que se alinea a una cadena del templado de ADN.

Las sondas se encuentran marcadas con un fluoróforo (los más comunes son VIC, FAM y ROX) por su extremo 5' y una molécula localizada en el extremo 3', que mantiene apagado al anterior denominando quencher. El fundamento de la técnica está basado en el uso de un termociclador, en el cual se separan las cadenas del ADN templado, se alinean los primers y la sonda con su secuencia complementaria. Cuando esto sucede, la polimerasa termoestable comienza a agregar dNTP's al templado, a partir de donde termina la secuencia del primer y al posicionarse en el nucleótido en donde comienza la hibridación de la sonda con el templado, retira al primer nucleótido 5' de dicha sonda mediante su actividad de exonucleasa, generando la liberación del fluoróforo, el cual emitirá su fluorescencia debido a que ya no se encuentra apagado por la molécula quencher. Es así como el equipo interpreta la medición de la señal emitida y la traduce en una curva de amplificación con la cual se puede detectar el producto obtenido y cuantificarlo en tiempo real (Valasek & Repa, 2005; Kubista, et. al., 2006).

En el caso de la genotipificación de SNP por PCR en Tiempo Real mediante sondas TaqMan®, se diseñan dos sondas marcadas con fluoróforos distintos, una de las sondas contiene en su secuencia al alelo ancestral y la otra al cambio polimórfico (Fig. 18).

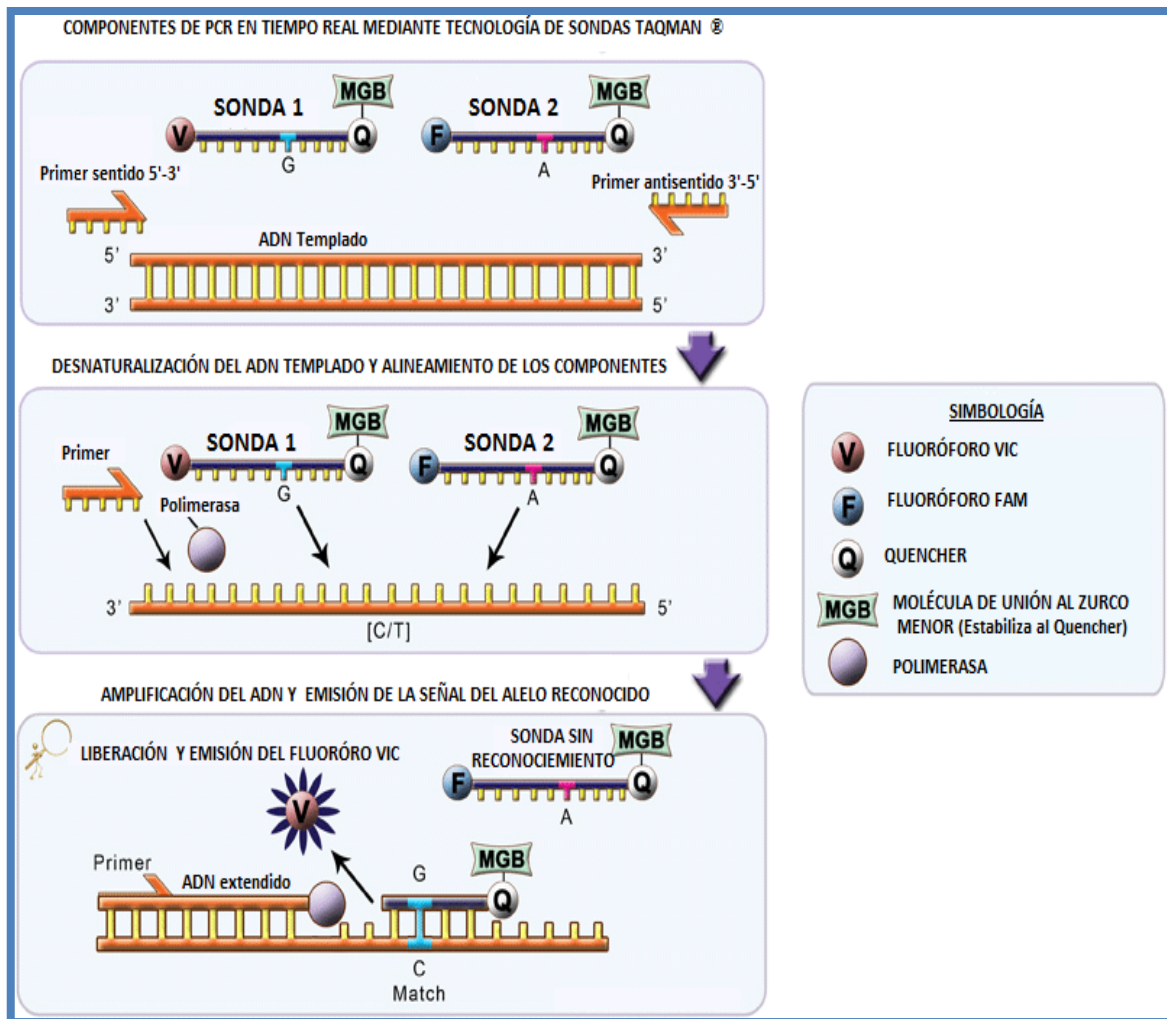


Fig. 18 Componentes y fundamento de la Genotipificación por PCR en Tiempo Real mediante tecnología TaqMan®. Un SNP, consta de dos alelos, un individuo puede tener una o dos copias de un alelo. Por tal motivo, esta técnica incluye el diseño de dos sondas marcadas con fluoróforos distintos. Una sonda contiene en su secuencia al nucleótido complementario al del alelo ancestral y la otra al nucleótido complementario al alelo polimórfico. Los alelos presentados por el individuo, dictaran la unión complementaria de las sondas al ADN molde. Al inicio de la PCR, la doble cadena se desnaturaliza, se unen los respectivos primers y se alinean las sondas a su región complementaria. La polimerasa comienza a extender el ADN, a partir del lugar donde se localizan los primers. Al llegar al lugar de posicionamiento de la sonda, por su actividad de exonucleasa, libera al primer nucleótido de dicha sonda, junto con el fluoróforo que emite la señal con la que se identificará un alelo (Modificado de <http://www.salimetrics.com/dna-analysis/snp-genotyping.php>).

El proceso de amplificación, revelará la detección de la señal de una o ambas sondas, dependiendo de los alelos de un SNP determinado en un individuo (Fig. 19 a,b,c). La intensidad de la fluorescencia emitida en la curva de amplificación para cada alelo, son interpretados por el Software del equipo en un diagrama de dispersión, gracias al cual puede llevar a cabo la discriminación alélica e identificación del genotipo correspondiente a cada uno de los individuos estudiados. Existen 3 genotipos posibles para cada polimorfismo: Homocigoto para el Alelo Ancestral, Heterocigoto y Homocigoto para el Alelo polimórfico (Fig. 19 d).

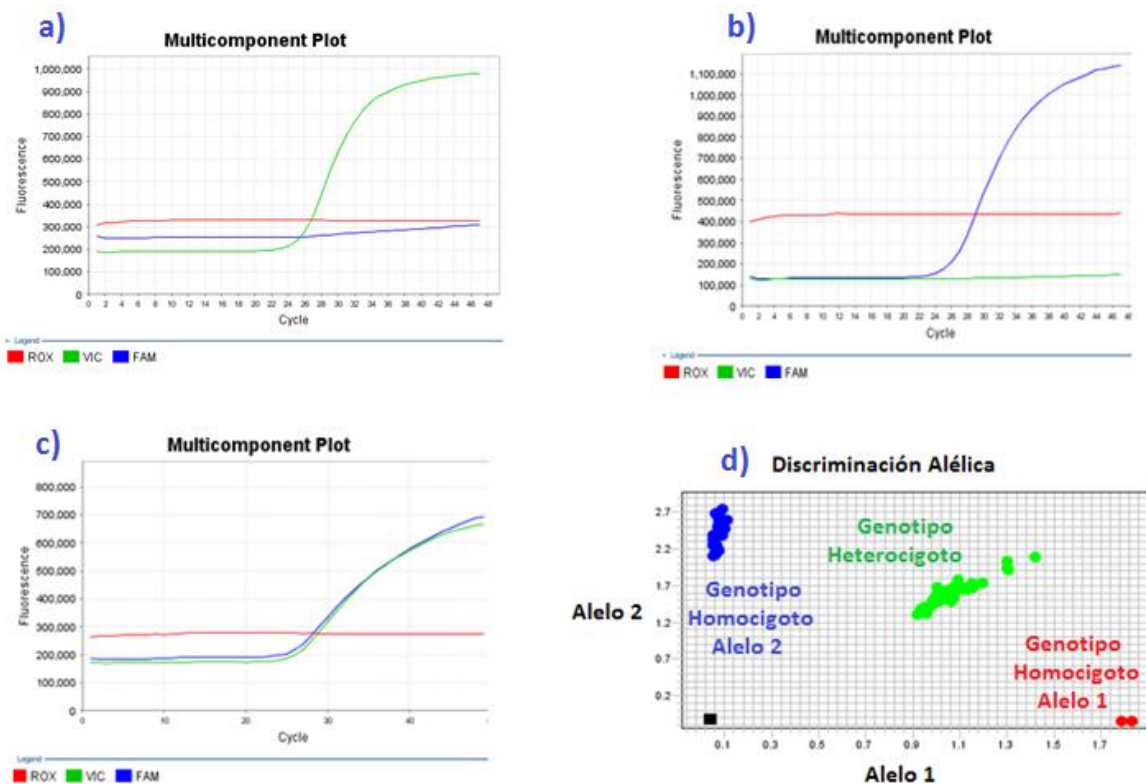


Fig. 19 Detección de la señal de amplificación de los alelos y su discriminación. Se presentan los tres posibles resultados de la señal de amplificación alélica: a) Amplificación del alelo marcado con VIC, por encima del fluoróforo basal ROX, lo que significa que el genotipo del individuo es Homocigoto para el alelo 1, en b) se observa que la amplificación del alelo marcado con FAM rebasa la fluorescencia basal, lo cual se interpreta como un genotipo Homocigoto para el alelo 2, y en c) se puede observar una amplificación bialélica lo que se conoce como un genotipo Heterocigoto. Las señales anteriores, son graficadas por el software del termociclador en un diagrama de dispersión, por medio del cual puede generar la discriminación de los genotipos de las muestras (Imágenes tomadas de algunas amplificaciones realizadas en el proyecto).

9.6 Genotipificación de SNP mediante PCR Tiempo Real.

La genotipificación de los SNP mediante PCR en Tiempo Real con tecnología TaqMan®, se llevó a cabo en un termociclador modelo 7500 Fast® de la marca Applied Biosystems. Para lo cual fue necesario estandarizar las condiciones ideales de reacción (Fig. 20).

Tabla 4. Estandarización para una reacción de PCR en Tiempo Real.

H2O	1.85 μ l
Master Mix	3.0 μ l
Sonda (40x)	0.15 μ l
ADN (10ng/ μ l)	1.0 μ l
47 ciclos de amplificación	

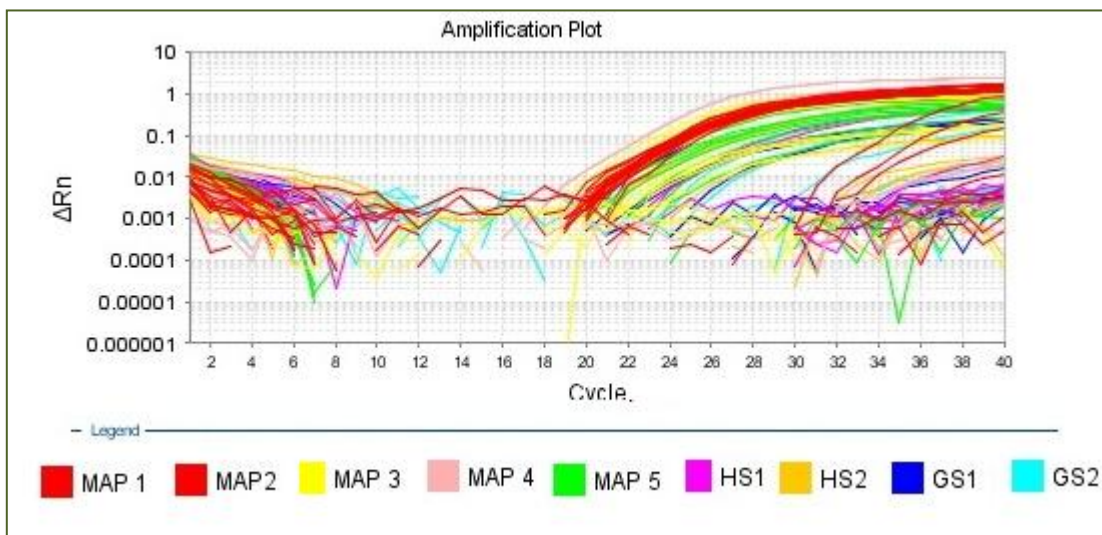


Fig. 20 Prueba de las sondas para los 9 SNP, mediante la reacción estandarizada de PCR en Tiempo Real. Se observa que todas las sondas que se diseñaron amplifican correctamente y que las proporciones de estandarización de la reacción de PCR, son las adecuadas para visualizar los resultados de las curvas de amplificación de los alelos (Obtenida del software del termociclador Applied Biosystems utilizado).

Una vez estandarizadas las condiciones de reacción y la verificación del buen funcionamiento de las Sondas TaqMan®, se procedió a realizar la genotipificación de las muestras de ADN de todos los individuos incluidos en el estudio. La reacción de cada muestra, se llevó a cabo por duplicado. Para cada sonda utilizada se incluyó un control negativo por duplicado (mezcla de reacción sin ADN)

9.7 Análisis estadístico de los resultados.

La obtención de frecuencias alélicas se llevo a cabo mediante el uso del programa de genética poblacional Genètix 4.05.2 (Belkhir, et. al., 2004) y las frecuencias genotípicas fueron determinadas en el programa Fstat 2.9.3.2. (Goudet, 2002). Nuestro estudio de asociación genética consta del análisis de múltiples SNP localizados en diferentes cromosomas, por tal motivo, fue necesario realizar un análisis de frecuencias de combinaciones multi loci presentes en cada uno de los tres grupos de estudio. La búsqueda hipotética de las combinaciones de los alelos, de los 9 polimorfismos estudiados en cada grupo, se realizó mediante el software Arlequin 3.11 (Excoffier, et. al., 2005).

Posteriormente, se planteó la necesidad de determinar la probabilidad de que una variante alélica, genotipo o genotipo multiloci contribuyan o no al desarrollo de la enfermedad en cuestión; para ello se toma en cuenta las frecuencias de dichas variantes en enfermos comparadas con sus frecuencias en los controles. Al cociente de dichas probabilidades se le denomina Razón de Momios (OR). Es un parámetro numérico, cuyo incremento se postula, es proporcional al incremento de riesgo y/o susceptibilidad para el desarrollo de una enfermedad (Lewis, 2002). La determinación de la OR se realizó ingresando las proporciones de las variantes polimórficas en el programa EpiInfo6 (Myatt, 1994). La determinación de la OR en este programa se realiza mediante la prueba estadística de Chi Cuadrada de Pearson con corrección de Mantel-Haenszel, utilizando tablas de contingencia 2x2, que son adecuadas para comparar tasas de prevalencia de un parámetro en casos y controles (expuestos o no expuestos a determinado factor). Esta prueba estadística evalúa la relación entre dos variables, tras su ajuste a una tercera variable de estratificación llamada

factor de confusión, de tal forma que se puede observar en qué medida una variable está siendo afectada por otros factores. Tiene como hipótesis central si existen o no diferencias significativas entre los datos comparados, y es ideal cuando se desconoce el modelo genético de los genes candidatos (Rial-Boubeta & Varela-Mallou, 2008; Rodríguez, et. al., 2009).

Para tener un parámetro de comparación de la composición genotípica de los grupos estudiados, se evaluó el Equilibrio de Hardy-Weinberg mediante una prueba exacta de Fisher, en el software Genètx 4.05.2 (Belkhir, et. al., 2004). La prueba utilizada debido a que se realiza una comparación entre grupos de una población en común es la de Fis. El programa compara las varianzas de las frecuencias alélicas y genotípicas esperadas en condiciones de Equilibrio y las obtenidas experimentalmente, por locus en cada uno de los grupos estudiados. De esta comparación, genera un valor de significancia estadística; sin embargo, se llevó a cabo la corrección de Bonferroni, la cual toma en cuenta el número de variantes analizadas ($0.05/\text{no. de marcadores polimórficos estudiados}$), para realizar un comparación con mayor fuerza estadística y determinar si la población varía o no, respecto al EQHW.

Como parte de la búsqueda de marcadores polimórficos de la EA en la población mexicana, también nos interesó evaluar si de los 9 SNP analizados, existían algunos que se heredaran por bloques a la siguiente generación y si este patrón podría ligarse a eventos de recombinación genética que confirieran a un individuo cierta susceptibilidad genética para desarrollar la enfermedad. Con base a esto, se realizó un análisis de Desequilibrio de Ligamiento, mediante el programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002). Estableciendo un test entre cada par de locis por cada grupo de estudio analizado, bajo un nivel nominal multi test de 1/1000.

Por último y como se había mencionado previamente en la introducción, para descartar asociaciones espurias debidas a la estructuración de la población, se determinó la subestructuración genética presentada por los individuos incluidos en este estudio, con el programa Structure 2.3.3 (Pritchard, et. al., 2000). Este programa emplea el método de estadística Bayesiana de Cadenas Monte Carlo–Markov (MCMC) y determina el número de subpoblaciones (k) probables en la muestra estudiada. Las MCMC se llevaron a cabo 700,000 veces, empleando un burn-in de 100,000, para eliminar con ello errores tipo I (rechazar una hipótesis verdadera) y tipo II (aceptar una hipótesis falsa). Como parte de esta evaluación, el programa arrojó el logaritmo natural de la probabilidad de k ($-\ln P k$), el que posteriormente fue transformado en probabilidad mediante una matriz matemática. También determinó las características genéticas de cada individuo representadas por un vector $q=q_1, \dots, q_k$, en donde q_k representa la proporción genómica de cada individuo que origina las subpoblaciones.

Después de determinar el número de subpoblaciones en la muestra estudiada, se utilizó el programa STRAT 1.1 (Pritchard, et. al, 2000), el cual realiza un análisis de la distribución de variantes alélicas presentadas por los casos y controles, contrastándola con la estratificación de la población previamente determinada. El programa utiliza el método de MCMC, considerando 700,000 repeticiones de las cadenas y un burn-in de 100,000. Obtiene un valor de p estadística, con el cual se determina si a pesar de la subestructuración de la población persisten diferencias significativas en la distribución de alelos y genotipos entre el grupo de pacientes y grupo control.

X. RESULTADOS

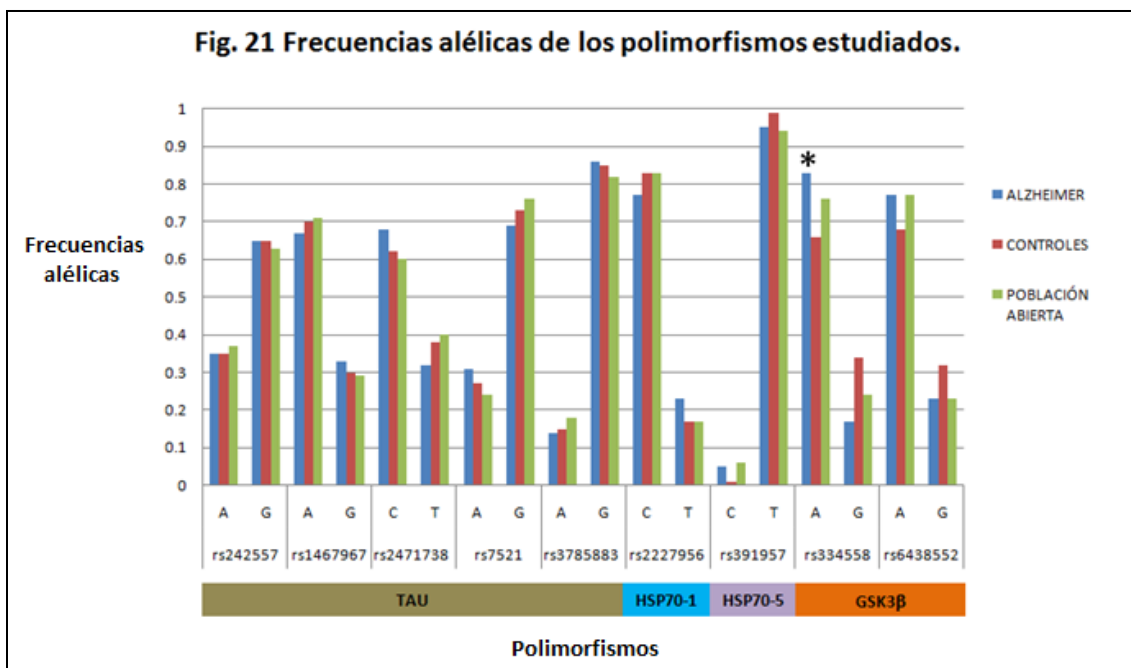
10.1 Frecuencias alélicas.

La distribución de cada uno de alelos, para los distintos polimorfismos estudiados, en los tres diferentes grupos, se encuentra en los Anexos VI, VII y VIII. Las frecuencias alélicas se calcularon mediante el programa Genètix y los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados.

	POLIMORSIFMO	ALELO	ALZHEIMER	CONTROLES	POBLACIÓN ABIERTA
TAU	rs242557	A	0.35	0.35	0.37
		G	0.65	0.65	0.63
	rs1467967	A	0.67	0.70	0.71
		G	0.33	0.30	0.29
	rs2471738	C	0.68	0.62	0.60
		T	0.32	0.38	0.40
	rs7521	A	0.31	0.27	0.24
		G	0.69	0.73	0.76
	rs3785883	A	0.14	0.15	0.18
		G	0.86	0.85	0.82
HSP70-1	rs2227956	C	0.77	0.83	0.83
		T	0.23	0.17	0.17
HSP70-5	rs391957	C	0.05	0.01	0.06
		T	0.95	0.99	0.94
GSK3 β	rs334558	A	0.83	0.66	0.76
		G	0.17	0.34	0.24
	rs6438552	A	0.77	0.68	0.77
		G	0.23	0.32	0.23

Como podemos observar, el alelo A del polimorfismo rs334558 del gen de la cinasa GSK3 β , es más frecuente en pacientes que en controles y población general. Este resultado puede verse también de manera gráfica en la Figura 21. La distribución del resto de los alelos no mostró diferencias importantes como puede verse en el Anexo IX.



Para determinar si está diferencia era estadísticamente significativa, se realizó un análisis estadístico, comparando la distribución del alelo A del polimorfismo rs334558 entre los diferentes grupos de estudio. Para ello empleamos la prueba de Chi Cuadrada y los resultados se muestran en la Tabla 6. Como podemos observar, sólo fue posible encontrar diferencia significativa en este polimorfismo cuando se compara el grupo de pacientes con el grupo control ($p= 0.0059$); obteniéndose una $OR=2.52$. Este resultado podría sugerir que la presencia del alelo A puede conferir hasta dos veces más riesgo de desarrollar la enfermedad.

Tabla 6. Comparación estadística para el Alelo A del polimorfismo rs334558.

Grupos de estudio	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	0.2213	1.5400
A vs. C	0.0059	2.5200

Alzheimer (A), Controles (C) y Población Abierta (PA).

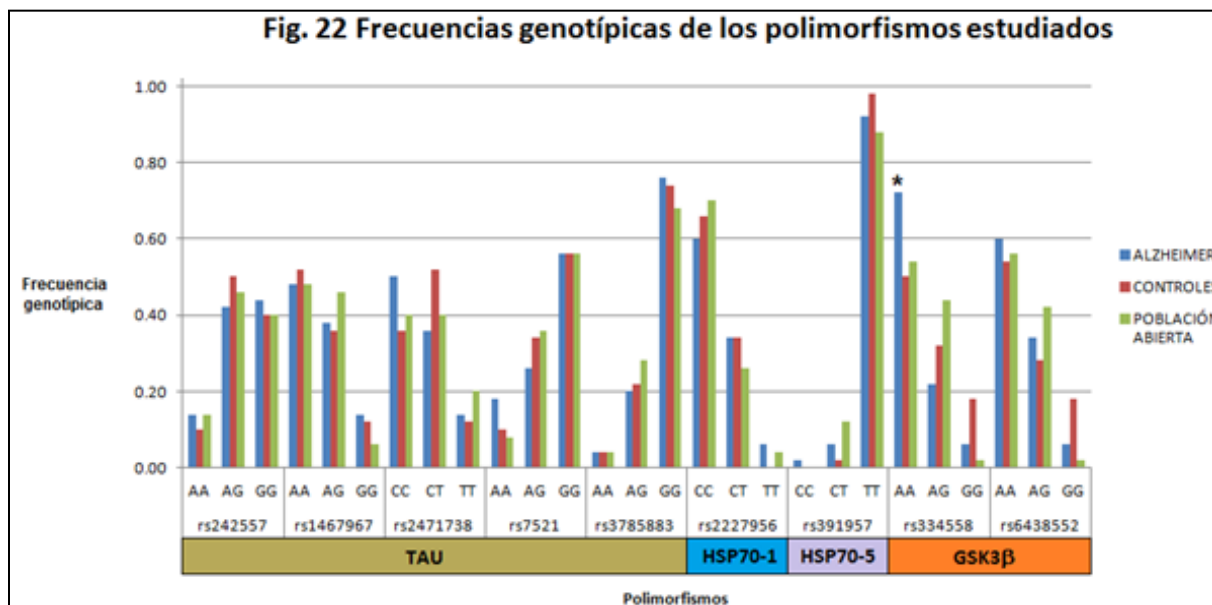
10.2 Frecuencias genotípicas.

Posterior al análisis de frecuencias alélicas, se determinaron las frecuencias de los genotipos presentes en la población de estudio (Tabla 7); los cuales se derivan de la segregación de los alelos parentales.

Tabla 7. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados.

	POLIMORSIFMO	ALELO	ALZHEIMER	CONTROLES	POBLACIÓN ABIERTA
TAU	rs242557	AA	0.14	0.1	0.14
		AG	0.42	0.5	0.46
		GG	0.44	0.4	0.4
	rs1467967	AA	0.48	0.52	0.48
		AG	0.38	0.36	0.46
		GG	0.14	0.12	0.06
	rs2471738	CC	0.50	0.36	0.4
		CT	0.36	0.52	0.4
		TT	0.14	0.12	0.2
	rs7521	AA	0.18	0.1	0.08
		AG	0.26	0.34	0.36
		GG	0.56	0.56	0.56
rs3785883	AA	0.04	0.04	0.04	
	AG	0.20	0.22	0.28	
	GG	0.76	0.74	0.68	
HSP70-1	rs2227956	CC	0.60	0.66	0.7
		CT	0.34	0.34	0.26
		TT	0.06	0	0.04
HSP70-5	rs391957	CC	0.02	0	0
		CT	0.06	0.02	0.12
		TT	0.92	0.98	0.88
GSK3 β	rs334558	AA	<u>0.72</u>	<u>0.5</u>	0.54
		AG	0.22	0.32	0.44
		GG	0.06	0.18	0.02
	rs6438552	AA	0.60	0.54	0.56
		AG	0.34	0.28	0.42
		GG	0.06	0.18	0.02

Al igual que en las frecuencias alélicas, en las frecuencias genotípicas, sólo se observan diferencias significativas en el polimorfismo rs334558 del gen de la cinasa GSK3 β . Como podemos observar en la Figura 22, no existe diferencias significativas en la distribución de los demás polimorfismos analizados.



De igual manera, se realizó una comparación estadística de cada una de las frecuencias genotípicas obtenidas a partir de los polimorfismos estudiados entre los distintos grupos de estudio (Anexo X). Como se puede observar en la Tabla 8, las diferencias significativas, sólo fueron evidentes en el polimorfismo rs334558. Las principales diferencias se encuentran cuando se compara el grupo de pacientes con EA y el grupo control, observándose con mayor frecuencia un genotipo homocigoto para el Alelo A en los pacientes a comparación con los controles ($p < 0.0014$, $OR = 2.57$) y la población general (0.0085 , $OR = 2.19$)⁷, por lo cual, la presencia de este genotipo podría representar un riesgo a desarrollar la EA.

Tabla 8. Comparación estadística para los genotipos del polimorfismo rs334558.

	DIFERENCIA ESTADÍSTICA					
	A/A		A/G		G/G	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	0.0085	2.1900	0.0009	0.3600	0.1499	0.3200
A vs. C	0.0014	2.5700	0.112	0.6000	0.0661	0.2900

10.3 Frecuencias de genotipos multiloci.

En la búsqueda de genotipos multiloci en los grupos estudiados, se encontraron 79 combinaciones (Anexos XI y XII), de las cuales únicamente 3, se encuentran con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer. En la Tabla 9, se muestran como se encuentran conformadas dichas combinaciones.

Tabla 9. Composición de combinaciones multiloci más frecuentes en los pacientes con EA.

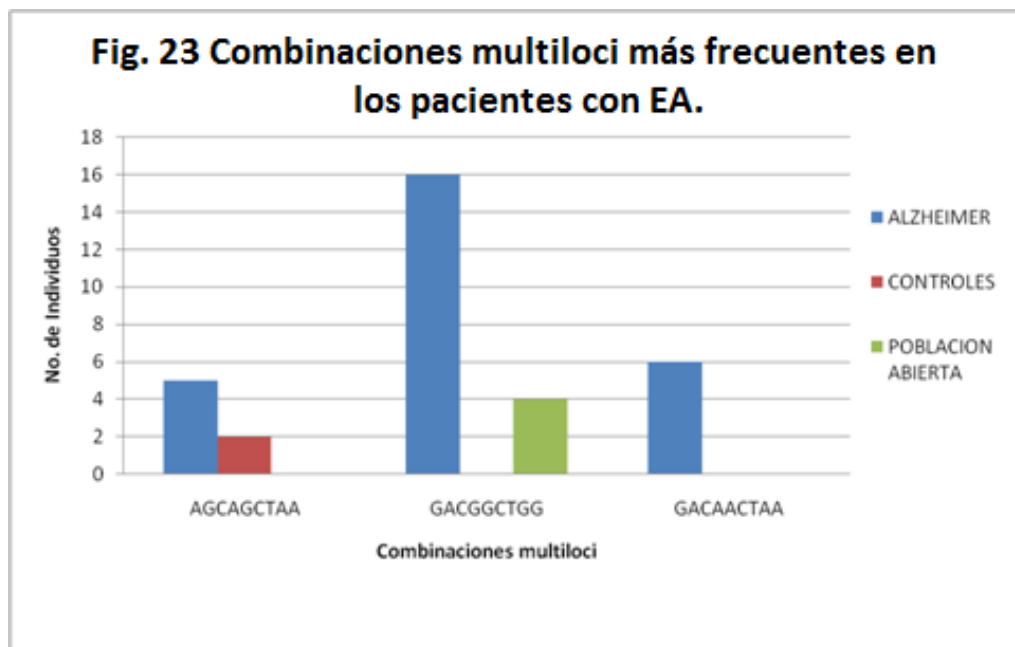
	COMPOSICIÓN DE COMBINACIONES MULTI LOCI								
	rs242557	rs1467967	rs2471738	rs7521	rs3785883	rs2227956	rs391957	rs334558	rs6438552
AGCAGCTAA	A	G	C	A	G	C	T	A	A
GACGGCTGG	G	A	C	G	G	C	T	G	G
GACAACAAA	G	A	C	A	A	C	T	A	A

En la Tabla 10, se muestran las frecuencias obtenidas de las tres combinaciones multiloci anteriormente descritas en los diferentes grupos estudiados. Podemos observar que a pesar de que las combinaciones no son exclusivas de los enfermos con Alzheimer, encuentran con menor frecuencia en los controles pareados por edad y en los individuos de la población general mexicana. Así mismo, se presentan los resultados obtenidos de la prueba de Chi cuadrada, en la que se compararon las frecuencias de las combinaciones en los grupos de estudio. Con estos resultados se comprueba que las tres combinaciones son más frecuentes en los pacientes, y los datos obtenidos en la razón de momios sugieren una posible asociación de dichas combinaciones con el desarrollo de la enfermedad en el grupo de estudio.

Tabla 10. Distribución de las combinaciones multiloci más frecuentes.

	ALZHEIMER	ALZHEIMER VS. CONTROL		CONTROLES	ALZHEIMER VS. POB. ABIERTA		POB. ABIERTA	CONTROL VS. POB. ABIERTA	
	Individuos	p	OR	Individuos	p	OR	Individuos	p	OR
AGCAGCTAA	5	0.242	2.67	2	0.0224	Indefinida	0	0.1551	Indefinida
GACGGCTGG	16	0.0000141	Indefinida	0	0.0028	5.41	4	0.0422	0
GACAACAAA	6	0.0119	Indefinida	0	0.0119	Indefinida	0	No comparable	No comparable

En la Figura 23, se encuentran graficadas las frecuencias de las tres combinaciones multiloci, observándose con mayor claridad que la presencia de estas combinaciones de variantes alélicas son más frecuentes en el grupo de pacientes.

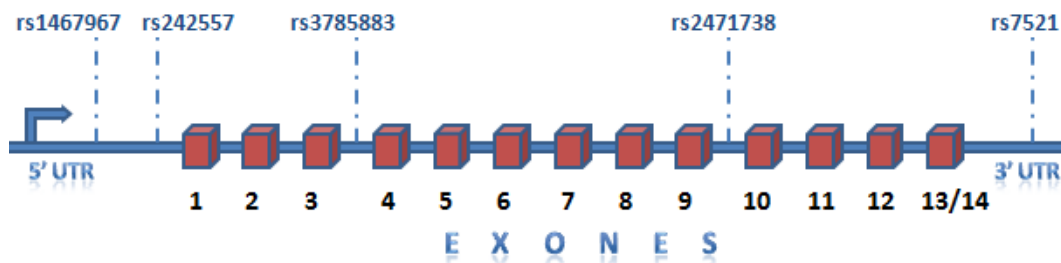


De la misma forma, clasificamos las combinaciones de las variantes alélicas de los polimorfismos del gen de la proteína Tau, denominados Haplotipos. En la Tabla 11, se muestran los 27 haplotipos, encontrados en los individuos estudiados (n=150).

La Tabla 12, muestra las frecuencias de cada uno de los haplotipos anteriores por grupo de estudio. También se registran los datos obtenidos de la comparación entre grupos mediante la prueba de Chi cuadrada. Debido a que se han realizado asociaciones genéticas de la presencia de ciertos haplotipos del gen de Tau con el desarrollo de la EA y otras tauopatías; identificamos algunos haplotipos y subhaplotipos previamente reportados en población caucásica. Se realizó una comparación de los resultados obtenidos en el presente estudio con los datos reportados en la literatura. Como podemos observar, se obtuvieron diferencias significativas para algunos haplotipos; sin embargo, el único que podría dar indicios de una posible asociación genética a la Enfermedad de Alzheimer es el conformado por las

variantes alélicas AGACA (H1h), debido a que presenta una frecuencia del 12% en pacientes con Enfermedad de Alzheimer y 0% en los controles y el grupo de población general mexicana ($p=0.119$, OR=indefinida).

Tabla 11. Haplotipos del gen de la proteína tau, presentes en las muestras estudiadas.



HAPLOTIPOS DEL GEN DE LA PROTEÍNA TAU					
	rs242557	rs1467967	rs2471738	rs7521	rs3785883
AAGTG	A	A	G	T	G
AGGTG	A	G	G	T	G
GAGCA	G	A	G	C	A
GGGCA	G	G	G	C	A
AGACG	A	G	A	C	G
AAGCG	A	G	G	C	G
AAACA	A	A	A	C	A
GAGCG	G	A	G	C	G
AAGCA	A	A	G	C	A
AGACA	A	G	A	C	A
GGGCG	G	G	G	C	G
GGACA	G	G	A	C	A
GGGTG	G	G	G	T	G
AGGTA	A	G	G	T	A
AGGCA	A	G	G	C	A
AAACG	A	A	A	C	G
GAGTG	G	A	G	T	G
AGATG	A	G	A	T	G
GGACG	G	G	A	C	G
GAACA	G	A	A	C	A
AAGCG	A	A	G	C	G
GAACG	G	A	A	C	G
AAATA	A	A	A	T	A
GAATG	G	A	A	T	G
GAGTA	G	A	G	T	A
AAGTA	A	A	G	T	A
GGATG	G	G	A	T	G

Tabla 12. Frecuencias haplotípicas en el gen de la proteína tau.

	ALZHEIMER	ALZ VS. CONT		CONTROL	ALZ VS. POB		POB. AB.	CONT VS. POB		ID
		p	OR		p	OR		p	OR	
AAGTG	9	0.4031	1.61	6	0.791	1.15	8	0.5663	0.72	H1c ¹
AGGTG	20	0.0168	0.38	32	0.1628	0.57	27	0.3117	1.51	H1 ²
GAGCA	8	0.2206	2.19	4	0.0149	9.33	1	0.3587	4.26	H1i ³
GGGCA	4	0.2206	2.19	8	0.139	0.4	9	0.791	0.87	H1b ¹
AGACG	2	0.242	0.38	5	0.242	0.38	5	1	1	H1l ³
AAGCG	22	0.4165	1.4	18	1	1	22	0.4165	1.4	H2a ¹
AAACA	2	0.402	0.48	4	0.1423	0.31	6	0.5071	0.64	H1 ²
GAGCG	12	0.3753	0.67	16	1	1	12	0.3753	0.67	H1 ²
AAGCA	4	0.3587	4.26	1	0.34	0.53	7	0.0277	0.13	H1d ¹
AGACA	6	0.0119	indef	0	0.0119	indef	0	n. c.	n. c.	H1h ³
GGGCG	2	0.402	0.48	4	1	1	2	0.402	0.48	H1 ²
GGACA	3	0.6965	0.73	4	0.4846	0.47	6	0.5071	0.64	H1 ²
GGGTG	3	0.0801	indef	0	0.648	1.53	2	0.1551	0	H1 ²
AGGTA	1	0.3173	indef	0	0.3173	indef	0	n. c.	n. c.	H1 ²
AGGCA	5	0.003	0.22	17	0.7504	0.81	6	0.009	3.78	H1e ¹
AAACG	1	0.5597	0.49	2	1	1	1	0.5597	0.49	H1 ²
GAGTG	1	0.0079	0.09	9	0.0079	0.09	9	1	1	
AGATG	1	0.3173	indef	0	0.1708	0.23	4	0.0422	0	
GGACG	1	0.3173	indef	0	0.3173	indef	0	n. c.	n. c.	
GAACA	1	0.3173	indef	0	0.3173	indef	0	n. c.	n. c.	
AAGCG	0	0.0119	0	6	0.0017	0	9	0.4031	0.62	
GAACG	0	0.3173	0	1	0.0119	0	6	0.0511	0.15	
AAATA	0	0.3173	0	1	0.3173	0	1	1	1	
GAATG	0	0.3173	0	1	n. c.	n. c.	0	0.3173	indef	
GAGTA	0	0.3173	0	1	n. c.	n. c.	0	0.3173	indef	
AAGTA	0	n. c.	n. c.	0	0.0224	0	5	0.0224	0	
GGATG	0	n. c.	n. c.	0	0.475	0	2	0.475	0	

n.c.=no comparable; indef=indefinido. ¹Myers, 2005. ²Pittman, 2005. ³ Mukherjee, 2007

Existen reportes de estudios de asociación genética de haplotipos en el gen de GSK3 β , derivados de las variantes alélicas de los polimorfismos rs334558 y rs6438552. Por tal motivo, identificamos los haplotipos presentes en los individuos de nuestro estudio. Los resultados de los haplotipos y sus respectivas frecuencias por grupo de estudio, se encuentran registrados en la Tabla 13. En la comparación de las frecuencias haplotípicas mediante la prueba de Chi Cuadrada, obtuvimos que el haplotipo AA/AG es más frecuente

en pacientes con EA (12%) que en controles y la población general (0%) ($p=0.119$, OR=indefinida). También se identificaron los haplotipos encontrados en otros estudios de asociación reportados en la literatura para la población caucásica y asiática.

Tabla 13. Frecuencias haplotípicas del gen de GSK3 β , presentadas por los individuos analizados.

rs334558/rs6438552 (-50) / Intrón 5	ALZHEIMER	ALZ VS. CONT		CONTROL	ALZ VS. POB		POB. AB.	CONT VS. POB		ID
		p	OR		p	OR		p	OR	
AA/AA	30	0.3173	1.50	25	0.5465	1.28	27	0.6903	0.85	TT/TT ¹
AG/AG	11	0.4906	0.73	14	0.0329	0.39	21	0.1442	0.54	TC/TC
AA/AG	6	0.0119	indef	0	0.0119	indef	0	n. c.	n. c.	TT/TC
GG/GG	3	0.1118	0.34	8	0.3098	3.13	1	0.0149	9.33	CC/CC ¹
AG/GG	0	0.3173	0.00	1	n. c.	n. c.	0	0.3173	indef	TC/CC ¹
GG/AA	0	0.3173	0.00	1	n. c.	n. c.	0	0.3173	indef	CC/TT
AG/AA	0	0.3173	0.00	1	0.3173	0.00	1	1.00	1.00	TC/TT

n. c.=no comparable; indef=indefinido. ¹Kwok, 2008.

10.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para comparar si la distribución de los genotipos homocigotos y heterocigotos se encuentran de acuerdo con lo esperado por la ecuación de Hardy-Weinberg, se determinó el índice de fijación de Wright o Fis, el cual fue comparado con el índice esperado en el Equilibrio, determinándose un valor estadístico (p). Se sabe que para que un valor sea estadísticamente significativo debe cumplir con una $p < 0.05$. Pero en este caso, tomamos en cuenta la corrección de Bonferroni ($p = 0.05/9 = 0.005$), por lo cual serán significativos aquellos resultados que presenten una $p < 0.005$. Los resultados de tal análisis se encuentran en la Tabla 14, en la cual puede observarse que tras la corrección de Bonferroni, el grupo de pacientes con Alzheimer presenta una variabilidad genotípica significativa en la evaluación de la variabilidad general por grupo.

Tabla 14. Determinación del Índice de Fijación de Wright para cada locus estudiado.

		Grupo	Fis	p	
VARIABILIDAD GRAL.		ALZ	0.17394	0.0008	
		CON	0.09846	0.0351	
		POB	-0.01161	0.637	
TAU	rs242557	ALZ	0.08696	0.385	
		CON	-0.08889	0.8275	
		POB	0.0234	0.5512	
	rs1467967	ALZ	0.15055	0.2282	
		CON	0.15274	0.2184	
		POB	-0.10707	0.8744	
	rs2471738	ALZ	0.18258	0.1664	
		CON	-0.09356	0.8281	
		POB	0.17647	0.1674	
	rs7521	ALZ	0.40075	0.0079	
		CON	0.14739	0.2422	
		POB	0.02326	0.5669	
	rs3785883	ALZ	0.17923	0.2232	
		CON	0.14715	0.2748	
		POB	0.06156	0.4805	
	HSP70-1	rs2227956	ALZ	0.05017	0.5038
			CON	-0.19512	1.0000
			POB	0.0887	0.4225
HSP70-5	rs391957	ALZ	0.37712	0.0982	
		CON	0.0000	1.0000	
		POB	-0.05376	1.0000	
GSK3 β	rs334558	ALZ	0.23	0.1227	
		CON	0.29623	0.0379	
		POB	-0.19645	0.9725	
	rs6438552	ALZ	0.05017	0.4923	
		CON	0.3654	0.0123	
		POB	-0.176	0.964	

10.5 Desequilibrio de ligamiento.

Como previamente se comento, se determinó la presencia de Desequilibrio de Ligamiento entre cada par de locus, para cada uno de los grupos estudiados, lo cual se refleja en las tablas 15,16 y 17. La p fue ajustada a un nivel nominal de 0.1% ($p < 0.000001$). Los valores

menores al valor anterior, se consideran estadísticamente significativos, con un probable desequilibrio de ligamiento entre dichos pares de locus.

Tabla 15. Determinación del Desequilibrio de Ligamiento en el grupo de pacientes con EA.

TAU					HSP70-1	HSP70-5	GSK3-β			
rs242557	rs1467967	rs2471738	rs7521	rs3785883	rs2227956	rs391957	rs334558	rs6438552		
-	0.00939	0.89853	0.7753	0.65767	0.27847	0.34933	0.85904	0.62756	rs242557	TAU
	-	0.42497	0.56755	0.13181	1.00000	0.40690	0.00166	0.0062	rs1467967	
		-	0.00276	0.37539	0.28231	0.72503	0.38104	0.12176	rs2471738	
			-	0.05333	0.49232	0.15336	0.34458	0.18224	rs7521	
				-	0.22256	1.00000	0.25153	0.09228	rs3785883	
					-	0.7749	0.34972	0.36261	rs2227956	HSP70-1
						-	1.00000	0.77515	rs391957	HSP70-5
							-	0.0000	rs334558	GSK3-β
								-	rs6438552	

Tabla 16. Determinación del Desequilibrio de Ligamiento en el grupo de Controles.

TAU					HSP70-1	HSP70-5	GSK3-β			
rs242557	rs1467967	rs2471738	rs7521	rs3785883	rs2227956	rs391957	rs334558	rs6438552		
-	0.02852	0.88339	0.87061	0.62457	0.12769	0.50013	0.35549	0.36767	rs242557	TAU
	-	0.0713	0.49365	0.12533	0.15403	0.47907	0.79140	0.65784	rs1467967	
		-	0.00001	0.51104	0.91171	1.00000	0.91451	0.74581	rs2471738	
			-	0.36449	0.74869	1.00000	0.52664	0.34157	rs7521	
				-	0.48851	1.00000	0.02679	0.04752	rs3785883	
					-	1.00000	0.43779	0.78797	rs2227956	HSP70-1
						-	1.00000	1.00000	rs391957	HSP70-5
							-	0.00000	rs334558	GSK3-β
								-	rs6438552	

Tabla 17. Determinación del Desequilibrio de Ligamiento en el grupo de Población Abierta.

TAU					HSP70-1	HSP70-5	GSK3-β			
rs242557	rs1467967	rs2471738	rs7521	rs3785883	rs2227956	rs391957	rs334558	rs6438552		
-	0.68525	0.53095	0.30245	0.21608	0.76268	0.17753	0.70212	0.74926	rs242557	TAU
	-	0.08366	0.01481	0.44603	0.12212	0.1147	0.65001	0.82227	rs1467967	
		-	0.01447	0.15277	0.63193	0.37424	0.02467	0.05966	rs2471738	
			-	0.10118	0.66805	0.05913	0.89076	0.79756	rs7521	
				-	0.80724	0.26989	0.36573	0.37813	rs3785883	
					-	0.00031	0.43396	0.42526	rs2227956	HSP70-1
						-	1.00000	1.00000	rs391957	HSP70-5
							-	0.00000	rs334558	GSK3-β
								-	rs6438552	

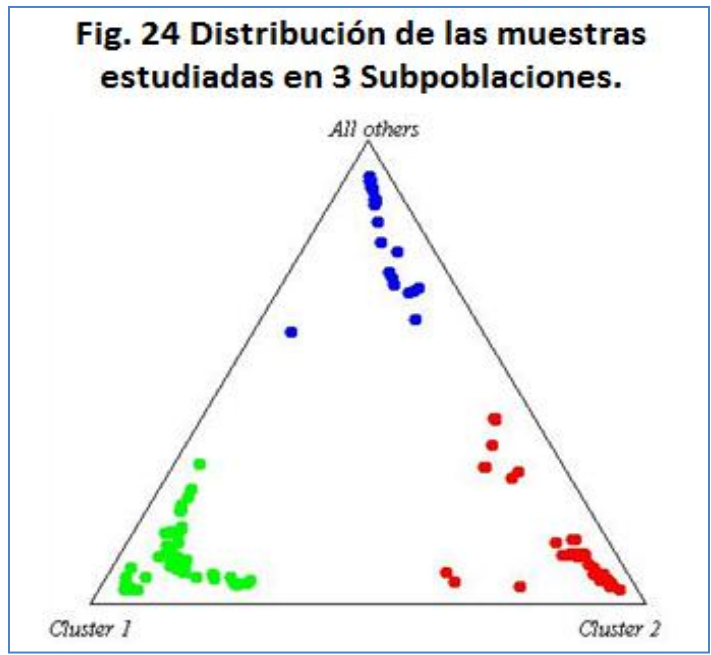
10.6 Estructura genética.

Se determinó de la estructura genética en las muestras analizadas, mediante el programa Structure, el cual utiliza métodos bayesianos. La finalidad era determinar el número de subpoblaciones presentes en la $n=150$ individuos estudiados y su composición genética a nivel individual. El programa se corrió bajo un método no supervisado, debido a que se desconocía el número de subpoblaciones “ k ” presentes en las muestras analizadas. Por tal motivo, se determinó la probabilidad de tener de 1 a 5 subpoblaciones, por quintuplicado, en cada caso se consideraron 700 000 repeticiones de cadenas de MCMC y 100 000 de burn-in. Para cada “ k ” estimada, se obtuvieron 5 valores del $-\ln P(k)$, los cuales fueron registrados en la Tabla 14, obteniéndose un promedio. Los valores determinados por el programa se utilizaron para construir una matriz matemática (Pritchard, et. al., 2000), a partir de la cual se obtuvo la probabilidad de encontrar k subpoblaciones presentes en la muestra analizada. Los resultados (Tabla 18) muestran que la $k=3$ fue la más probable ($P \approx 1$), con lo cual se infiere la presencia de 3 subpoblaciones en nuestra muestra.

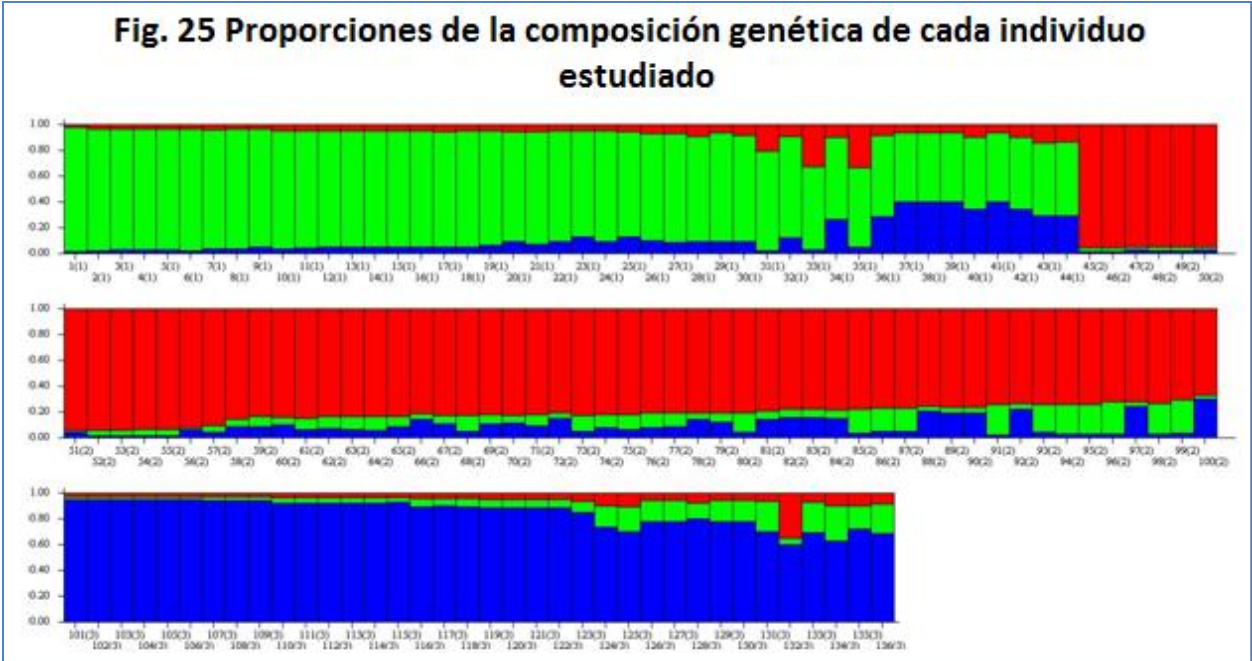
Tabla 18. Resultados de la determinación del $-\ln P$, para cada “ k ” estimada.

Valor de k	(-) $\ln P$ Ejecuciones ($k=n$)					Promedio	P
	$k=1$	-1427.2	-1427.2	-1427.3	-1427.4		
$k=2$	-1347.1	-1350.6	-1349.3	-1346	-1347.1	-1348.02	2.254E-121
$k=3$	-1299.6	-1311	-1298.1	-1298.8	-1298.4	-1301.18	1
$k=4$	-1347.1	-1345.4	-1342.1	-1344.7	-1348.6	-1345.58	1.8111E-17
$k=5$	-1484.2	-1412.4	-1393.1	-1452.5	-1453.8	-1439.2	8.1518E-38

Posteriormente, se corrió el programa estableciéndose una $k=3$ (700 000 veces de MCMC y 100 000 de burn-in) y se obtuvo un diagrama de triángulo (Fig. 24) en donde se muestran a los individuos del estudio, distribuidos en 3 subpoblaciones (verde, rojo y azul).



De igual forma, el programa brindó en un diagrama de barras (Fig. 25), la proporción de la composición genética de cada individuo de los grupos estudiados.



Finalmente se realizó la corrección de las proporciones alélicas y genotípicas, en casos y controles, tomando en cuenta la subestructuración de las muestras correspondientes de ambos grupos. Este análisis se realizó mediante el programa STRAT, asumiendo una $k=3$ y fijando una repetición de 700 000 MCMC y un burn-in de 100 000. En la Figura 26, se muestra el resultado del test de Chi cuadrada realizado por el programa, tomando en cuenta 1 grado de libertad. Se obtuvo una $p < 0.002$, la cual es significativa.

Fig. 26 Resultado de la corrección de las proporciones alélicas y genotípicas debido a la subestructuración de la población

```
-----  
STRAT by Pritchard, Stephens, Rosenberg and Donnelly (AJHG, 2000)  
Code by J.K. Pritchard  
Version 1.1 June 2003  
-----  
  
Input data file = CACO  
Structure Results file = results  
Number of populations = 3  
Using phenotype column: 2  
Number of simulated test stats per locus = 1000  
EM stopping point = 1.000e-003  
Alleles with fewer than 10 copies pooled  
  
1: chisq= 7.606 1 df; TS = 3.86, p = 2.00000e-003 **
```

XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La epidemiología molecular es una herramienta fundamental para caracterizar enfermedades complejas y realizar un seguimiento; mediante este tipo de metodologías se pretenden establecer nuevas estrategias que ayuden en la prevención y orientación al paciente y a sus familiares. También plantea la necesidad de identificar individuos con una carga genética particular, que los predisponga al desarrollo de enfermedades multifactoriales y poligénicas.

En términos generales, los estudios genéticos de asociación entre casos y controles, permiten determinar la posible relación estadística entre las variables genéticas poblacionales y ciertos fenotipos determinados; que ayuden a identificar genes candidatos que puedan estar relacionados con el desarrollo de enfermedades complejas. Estos estudios, pueden llevarse a cabo mediante un análisis completo del genoma (GWAS) o con un

análisis de locus específicos en los que se determinan las frecuencias alélicas, genotípicas y de genotipos multiloci (Attia, et. al, 2009).

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un tipo de desorden complejo, caracterizado por un proceso neurodegenerativo de inicio en corteza entorrinal e hipocampo. Como previamente se describió, existen dos lesiones histopatológicas reveladas en el estudio post mortem, las Placas Neuríticas (PN) y las Marañas Neurofibrilares (MNF). Ambas lesiones forman parte del diagnóstico confirmatorio de la enfermedad. Las MNF, se encuentran constituidas principalmente por agregados de la proteína de unión a microtúbulos “Tau”, en un estado hiperfosforilado y truncado (Wang, et. al., 2009) y se ha demostrado que la cantidad de MNF presentes en el cerebro de los pacientes, determina la severidad del cuadro demencial. Al no existir un diagnóstico temprano de la enfermedad, resulta de gran relevancia estudiar genes relacionados con los procesos de hiperfosforilación y degradación de la proteína; que pudieran predisponer al desarrollo de la patología y formar parte del diagnóstico molecular, apoyando así al diagnóstico presuntivo que actualmente se realiza.

En este sentido, existen reportados en la literatura diversos estudios de asociación genética en casos y controles mediante el análisis de SNP en el gen de la Proteína Tau, el gen de la cinasa GSK3 β y en los genes de Proteínas de Choque Térmico (HSP). Los estudios reportados han sido realizados en poblaciones Caucásica y Asiática, más no en la población Mestizo Mexicana (www.alzforum.org). Con base en esto se planteó en el presente proyecto, analizar la presencia de polimorfismos en los genes mencionados en una muestra de 50 pacientes mexicanos diagnosticados clínicamente con EA, 50 controles pareados por edad sin datos clínicos de demencia y 50 individuos de la población general mexicana. Incluimos este último grupo con la finalidad de observar la distribución de las variantes genéticas en una muestra de la población general menor a 60 años y ubicar a aquellas variantes que pudieran ser propias de la población mestiza mexicana.

Infiriendo que la diferencia observada en la composición genotípica entre los pacientes, controles y la población general, podría asociarse con el riesgo a desarrollar la EA, analizamos las variantes alélicas de cada *locus* estudiado. A este respecto no encontramos

diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas en los 5 polimorfismos analizados del gen de la proteína Tau. De acuerdo a lo reportado en la literatura, la mayoría de los estudios realizados en poblaciones Caucásicas y Asiáticas, concuerdan con nuestros resultados (Abraham, et. al., 2009; Cousin, et. al., 2009; Feulner, et. al., 2009; Laws, et. al., 2006; Mukherjee, et. al., 2007; Kwok, et. al., 2008). Sin embargo, un estudio realizado en población caucásica, con muestras del Reino Unido y de Estados Unidos (Myers, et. al., 2005), sugiere que el alelo A del polimorfismo rs242557 y el alelo T del polimorfismo rs2471738 podrían asociarse con el desarrollo de la enfermedad en la población estadounidense. La falta de replicación de estos resultados en otras poblaciones caucásicas (Conrad, et. al., 2004; Clark, et. al., 2003; Baker, et. al., 2000; Kwok, et. al., 2008; Laws, et. al., 2006), así como en nuestra muestra de población mestiza mexicana, nos hace suponer que la diferencia observada en la frecuencia del alelo T del polimorfismo rs2471738 entre pacientes y controles, puede ser el resultado de un alto índice de flujo génico en la población estadounidense, lo cual subestructura a la población y cambia las características ancestrales, un factor determinante en los estudios de asociación genética.

Por lo que respecta a las Proteínas de Choque Térmico (HSPs), no encontramos alelos o genotipos asociados con el desarrollo de la EA, en los polimorfismos rs2227956 del gen de la HSP70-1 y rs391957 de la HSP70-5; resultados que concuerdan con los obtenidos en cohortes de población de origen Caucásico y Asiático (Hsu, et. al., 2008; Lehmann, et. al., 2001).

Los resultados de los polimorfismos estudiados en el gen de la cinasa GSK3 β , mostraron que el alelo A del polimorfismo rs334558 fue el más frecuente en el grupo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer a diferencia del grupo Control ($p < 0.0014$) y de la Población General ($p < 0.0085$), presentando una razón de momios (OR) mayor a 2.0, lo que sugiere que los individuos que presenten este alelo tendrían 20 veces más riesgo de desarrollar la EA.

Al analizar las frecuencias genotípicas de este polimorfismo, descubrimos que el estado homocigoto para el alelo A, se presenta en mayor proporción en los pacientes con EA que

en los Controles ($p < 0.0248$), obteniéndose OR de 2.57, siendo congruente con lo encontrado para las frecuencias alélicas. En primera instancia, los datos sugieren que el alelo A y el genotipo AA del polimorfismo mencionado, podrían estar relacionados con el riesgo a desarrollar la Enfermedad de Alzheimer en nuestra población. Sin embargo, es necesario considerar la composición genotípica de las muestras estudiadas, ya que el resultado obtenido podría deberse a errores de tipo I (rechazar una hipótesis verdadera) y tipo II (aceptar una hipótesis falsa), considerando la compleja composición genética de la población mestiza.

Para tal efecto, se determinó el Equilibrio de Hardy & Weinberg (EQHW). Los resultados obtenidos muestran que la población con EA presenta una desviación importante ($p < 0.0008$) con respecto a lo esperado por HW, contrario a lo observado en las poblaciones control y general. Ésta condición de desequilibrio podría estar asociada a la presencia de la enfermedad, caracterizándose por la presencia de un exceso de homocigotos ($Fis = 0.17394$). A este respecto, es importante destacar que en los sistemas bialélicos como los SNP, resulta difícil encontrar desequilibrio con respecto a la ecuación matemática de Hardy-Weinberg (DHW), debido al bajo poder de discriminación de dichos sistemas. Este hecho sugiere que la combinación de los marcadores utilizados podría estar asociada con la enfermedad.

Una de las principales causas relacionadas con el DHW corresponde a la subestructuración genética de la población. En este sentido, la composición genética de la población mestiza mexicana es compleja y cuenta con una distribución ancestral asimétrica relacionada con la clase socioeconómica. Estudios recientes realizados con marcadores de sistemas sanguíneos (Lisker, et. al., 1990), marcadores ancestrales tipo SNP (Martínez-Fierro, et. al., 2009) y marcadores hipervariables tipo STR autosómicos y patrilineales (Gómez, et. al., 2007), demuestran que nuestra población se encuentra constituida principalmente por 3 ancestrías: Amerindia, Europea y Africana. Estas características ancestrales, pueden eventualmente incrementar la presencia de errores tipo I y II, y generar desviaciones en la evaluación del EQHW. Por tal motivo, determinamos el número de subpoblaciones de mayor probabilidad (k) en las muestras estudiadas, observando la presencia de 3 subpoblaciones (Fig. 24). Con este dato realizamos una corrección estadística por subestructuración, empleando métodos

bayesianos con el programa *Strat*. El resultado sugiere que la diferencia previamente observada entre casos y controles, en cuanto a la distribución del Alelo A del polimorfismo rs334558; se conserva, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.002$). Esto nos indica que la presencia de este alelo (en una o dos copias) es un factor genético que podría contribuir al desarrollo de la EA en nuestra población ($OR = 2.5$). Este resultado se replica en poblaciones de Santander en España ($OR = 1.99 / p < 0.003$; Mateo, et. al., 2006), Han China ($OR = 1.38 / p < 0.002$; Zhang, et. al., 2011), Reino Unido ($OR = 1.72 / p < 0.007$; Kwok, et. al., 2008) y Australiana ($OR = 2.54 / p < 0.034$; Kowk, et. al, 2008); las cuales son más homogéneas que la población mestiza mexicana, la cual mostró subestructuración genética alta. Sumado a fenómeno de subestructuración y considerando el tamaño reducido de la muestra empleada en nuestro estudio, la correlación de los resultados, nos indica que la presencia de este alelo está asociada con el desarrollo de la EA.

Otro hecho que podría incrementar la relevancia de la asociación, es la ubicación del polimorfismo rs334558, el cual se localiza en la región promotora (-50) del gen de la cinasa GSK3 β y se ha propuesto que influye en la eficiencia de la transcripción. En este sentido, un estudio de funcionalidad en pacientes con Enfermedad de Parkinson, reveló que los portadores del alelo G producen una menor cantidad de la enzima, a comparación de los portadores del Alelo A, sugiriendo que esta relación podría incrementarse dependiendo del número de copias de alelos que se presente (Kwok, et. al., 2005; Galimberti, et. al., 2011). Haciendo una analogía, creemos que la presencia de dos copias del Alelo A podría generar un efecto como el observado en ratones transgénicos que sobreexpresan la cinasa. Estos ratones muestran un aumento en los niveles de Tau hiperfosforilada y la aparición de agregados fibrilares de la proteína, así como cambios en la memoria y el aprendizaje (Hooper, et. al., 2008; Hernández, et. al., 2009; Hernández, et. al., 2010); todas ellas, alteraciones presentes en el desarrollo de la patología tipo Alzheimer.

Sin embargo, considerando la complejidad de la EA y a pesar de la asociación encontrada, realizamos un estudio de genotipos multiloci (conocidos también como haplotipos). Este tipo de análisis nos pueden brindar una forma más idónea para encontrar asociaciones

genéticas con la enfermedad que correlacionen mejor con su naturaleza multifactorial y poligénica. En este sentido, investigaciones realizadas en otras poblaciones sugieren una interacción entre GSK3 β y otros *loci* (Tabla 19), al tiempo que refuerzan el impacto del alelo A (rs334558) en la asociación con el fenotipo patológico de la EA.

Tabla 19. Estudios de interacción de GSK3 β con otros *loci*.

AUTOR	POBLACIÓN	AÑO	LOCI	N	p
Zhang, N.	Han, China	2011	GSK3 β /APOE/MAPT	257	0.017
García-Gorostiaga I.	Santander, España	2009	GSK3 β /MAPT	285	0.02
Kowk, JB.	Reino unido	2008	GSK3 β /MAPT	604	0.004

Cabe señalar que a la fecha no existen en la literatura, estudios reportados que analicen de manera integral los genes de las proteínas Tau, GSK3 β y HSPs, lo cual resulta de suma importancia, debido a que es necesario analizar los aspectos relacionados con la fosforilación de Tau y considerar los mecanismos involucrados en los procesos de degradación de la proteína en estado agregado.

En este sentido, el estudio de genotipos multiloci empleando los 9 SNP analizados, muestra la presencia de 3 combinaciones que son más frecuentes en los pacientes con EA que en los controles y la población abierta, presentándose en el 55% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer. De forma independiente, la combinación multiloci GACGGCTGG se presentó en el 32% de los pacientes, mientras que no se encontró en la población control y se observó en el 8% de población general ($p < 0.0000141$). Por su parte, los haplotipos AGCAGCTAA y GACA ACTAA se presentaron en el 10% y 12% de la población de EA respectivamente, mostrando bajas frecuencias en los grupos control y población general. Debido a estas diferencias importantes, creemos que las 3 combinaciones son candidatas potenciales, que pueden asociarse con un incremento en la predisposición genética para el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer en la población mestizo mexicana. Sin embargo, para corroborar esta idea es necesario que los resultados se repliquen, incrementando el tamaño de muestra y comparando los resultados con otras poblaciones.

Por lo que respecta al análisis de combinaciones multiloci del gen de la proteína Tau, obtuvimos que el haplotipo H1 es el más frecuente en la muestra de población mestiza. La variante H1h (Tabla 12), se presentó con mayor frecuencia (12%) en el grupo de individuos con EA y está ausente en las poblaciones de controles y general. Por su parte, Myers y colaboradores (Myers, et. al., 2005) describieron que el haplotipo de riesgo en población Caucásica es el H1c, encontrándolo en el 14 % en los pacientes y en el 9% en los controles. Lo anterior no es congruente con nuestros resultados, por lo que discrepamos de afirmar que la presencia de H1c predispone a un individuo a desarrollar la EA.

IX. CONCLUSIONES.

El presente estudio de asociación genética reveló que la presencia del Alelo A (en una o dos copias) en el polimorfismo rs334558 del gen de la cinasa GSK3 β , podría asociarse con un incremento de 2.5 veces más riesgo para desarrollar EA de tipo esporádico, en individuos de la población mestiza mexicana.

Los genotipos multiloci GACGGCTGG, AGCAGCTAA y GACAACTAA, derivados de las combinaciones alélicas en los genes de la proteína Tau, GSK3 β , HSP70-1 y HSP70-5; pudieran contribuir al desarrollo de la patología.

El análisis realizado en el presente estudio hace replantear la necesidad de utilizar un esquema de métodos analíticos de genética poblacional, que sean adecuados para discriminar entre asociaciones verdaderas y falsas; sin importar el tamaño de muestra empleado o la complejidad genética de la población en cuestión.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abraham R, Sims R, Carroll L, Hollingworth P, O'Donovan MC, Williams J, Owen MJ. (2009). An association study of common variation at the MAPT locus with late-onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.*;150B(8):1152-5.
- ❖ ADI. (2009). Informe Mundial sobre el Alzheimer, Resumen ejecutivo.
- ❖ Allinson T, Parkin E, Turner A, Hooper N. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res*, 74:342-352.
- ❖ Alonso A. (2009). Mecanismo de la neurodegeneración inducida por la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer y taupatías relacionadas. *Alzheimer, Real Invest Demenc*; 42:23-31.
- ❖ Alonso A, Grundke-Iqbal I, Barra H, and Iqbal K. (1997). Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci*; 94: 298–303.
- ❖ Alonso A, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci*; 91:5562–5566.
- ❖ Alzheimer A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych-Garichtl Med*. 64: 146-148.
- ❖ Alzheimer A. (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zbl ges Neurol Psych*. 4: 356-358.
- ❖ Anzola-Pérez E, Bangd S, Barrientos G, de la Vega, M, Dominguez O, Bern-Klug M. (1996) Community Diagnosis of Dementia Testing Cognitive Impairment in Older Persons in Argentina, Chile and Cuba. *Int J Ger Psych*, 11:429-438.
- ❖ Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, Thompson J, Infante-Rivard C, Guyatt G. (2009). How to use an article about genetic association: A: Background concepts. *JAMA*; 301:74-81.

- ❖ Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, Thompson J, Infante-Rivard C, Guyatt G. (2009). How to use an article about genetic association: B: Are the results of the study valid? *JAMA*; 301(2):191-7.
- ❖ Ávila J, Lucas J, Pérez M, Hernández F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev*; 84: 361–384.
- ❖ Baker M, Graff-Radford D, Wavrant DeVrièze F, Graff-Radford N, Petersen RC, Kokmen E, Boeve B, Myllykangas L, Polvikoski T, Sulkava R, Verkonniemi A, Tienari P, Haltia M, Hardy J, Hutton M, Perez-Tur J. (2000). No association between TAU haplotype and Alzheimer's disease in population or clinic based series or in familial disease. *Neurosci Lett.*; 285(2):147-9.
- ❖ Bamberg J, Bray D, Chapman K. (1986). Assembly of microtubules at the tip of growing axons. *Nature*; 321: 788–790.
- ❖ Barrow CJ, Small DH. (2007). *Abeta Peptide and Alzheimer's Disease*. Springer. 298 p.
- ❖ Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- ❖ Billingsley M, Kincaid R. (1997). Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem. J*; 323: 577-591.
- ❖ Bird T. (2003). Alzheimer disease overview. *Gene reviews*. 1-11.
- ❖ Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. (2001). Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology*; 57(7):1153-4.
- ❖ Blennow K, De Leon M, Zetterberg H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet*. 368(9533):387-403.
- ❖ Blennow K, Hampel H. (2003). CSF markers for incipient Alzheimer's disease, *Lancet Neurol* 2; 605–613.
- ❖ Braak H, Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*; 82(4):239-59.

- ❖ Brandt R, Leger J, Lee G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino terminal projection domain. *J Cell Biol*; 131: 1327-1340.
- ❖ Brehmer D, Rudiger S, Gassler CS, Klostermeier D, Packschies L, Reinstein J, Mayer MP, Bukau B. (2001). Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol.*; 8:427–432.
- ❖ Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof P. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*; 33: 95–130.
- ❖ Butterfield D. (2002). Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res*; 36(12):1307-13.
- ❖ Campos-Peña V, Meraz M. (2006). Marcadores moleculares de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Mex Neuroci*; 7(4): 293-299.
- ❖ Campos-Peña V, Tapia-Ramírez J, Sánchez-Torres C, Meraz-Rios MA. (2009). Pathological-like assembly of tau induced by a paired helical filament core expressed at the plasma membrane. *J Alzheimers Dis.*; 18(4):919-33.
- ❖ Cardon LR, Bell JL. (2001). Association study designs for complex diseases. *Nature Reviews Genetics*; 2(2):91-9.
- ❖ Clark LN, Levy G, Tang MX, Mejia-Santana H, Ciappa A, Tycko B, Cote LJ, Louis ED, Mayeux R, Marder K. (2003). The Saitohin 'Q7R' polymorphism and tau haplotype in multi-ethnic Alzheimer disease and Parkinson's disease cohorts. *Neurosci Lett.*; 347(1):17-20.
- ❖ Cleveland D, Hwo S, Kirschner M. (1977). Purification of tau, a microtubule associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116: 207–225.
- ❖ Conrad C, Vianna C, Schultz C, Thal DR, Ghebremedhin E, Lenz J, Braak H, Davies P. (2004). Molecular evolution and genetics of the Saitohin gene and tau haplotype in Alzheimer's disease and argyrophilic grain disease. *J Neurochem.*; 89(1):179-88.
- ❖ Cordell HJ, Clayton DG. (2005). Genetic association studies. *Lancet*; 366: 1121–31.

- ❖ Corder E, Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Small G, Roses A, Haines J, Pericak-Vance M. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*; 13,261(5123):921-3.
- ❖ Correas L, Díaz-Nido J, Ávila J. (1992). Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem*; 267: 15721-8.
- ❖ Cousin E, Macé S, Rocher C, Dib C, Muzard G, Hannequin D, Pradier L, Deleuze JF, Génin E, Brice A, Campion D. (2009). No replication of genetic association between candidate polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*; 32(8):1443-51.
- ❖ Cruts M, Van Broeckhoven C. (1998). Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat*; 11: 183-90.
- ❖ Dalla Barba G, Traykov L, Baudic S. (2008). Neuropsychological examination in dementia. *Handbook of Clinical Neurology*; 89: 15-33.
- ❖ Dartigues J. (2009) Alzheimer's disease: a global challenge for the 21st century. *Lancet Neurol*; 8:1082-3.
- ❖ David DC, Layfield R, Serpell L, Narain Y, Goedert M, Spillantini MG. (2002). Proteasomal degradation of tau protein. *Journal of Neurochemistry*; 83(1):176-85.
- ❖ De Strooper B, Annaert W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*; 113:1857-1870.
- ❖ De Strooper B, Woodgett J. (2003). Alzheimer's disease: Mental plaque removal. *Nature*; 423(6938):392-3.
- ❖ Dickey CA, Koren J, Zhang YJ, Xu YF, Jinwal UK, Birnbaum MJ, Monks B, Sun M, Cheng JQ, Patterson C, Bailey RM, Dunmore J, Soresh S, Leon C, Morgan D, Petrucelli L. (2008). Akt and CHIP coregulate tau degradation through coordinated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105(9):3622-7.
- ❖ DSM-IV. (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4 th. edition. Washington: American Psychiatric Association.
- ❖ Dubois B, Feldman H, Jacova C, et al. (2007). "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria". *Lancet Neurol* 6(8): 734–46.

- ❖ Elkouby YM, Frank D. (2010). Wnt/ β -Catenin Signaling in Vertebrate Posterior Neural Development. Morgan & Claypool Life Sciences; 1-15 p.
- ❖ Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2005). Arlequin version 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online*; 1:47-50.
- ❖ Ferri C, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 17; 366 (9503):2112-7.
- ❖ Feulner TM, Laws SM, Friedrich P, Wagenpfeil S, Wurst SH, Riehle C, Kuhn KA, Krawczak M, Schreiber S, Nikolaus S, Förstl H, Kurz A, Riemenschneider M. (2009). Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study. *Mol Psychiatry*; 15(7):756-66.
- ❖ Frame S, Cohen P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochemistry Journal*; 359: 1-16.
- ❖ Galimberti D, Macmurray J, Scalabrini D, Fenoglio C, De Riz M, Comi C, Comings D, Cortini F, Villa C, Serpente M, Cantoni C, Ridolfi E, Fardipoor MH, Leone M, Monaco F, Bresolin N, Scarpini E. (2011). GSK3 β genetic variability in patients with Multiple Sclerosis. *Neurosci Lett.*; 497(1):46-8.
- ❖ García S, Coral R, Meza E, Lucino J, Martínez B. (2009). Enfermedad de Alzheimer: una panorámica desde su primera descripción hacia una perspectiva molecular. *Med Int Mex*; 25(4):300-12.
- ❖ García-Gorostiaga I, Sánchez-Juan P, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Quintana C, del Olmo SC, Vázquez-Higuera JL, Berciano J, Combarros O, Infante J. (2009). Glycogen synthase kinase-3 beta and tau genes interact in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Ann Neurol.*; 65(6):759-61.
- ❖ Gutiérrez L. Prevalence of Dementia and Mild Cognitive Impairment in Subjects 65 Years and Older in Mexico City. An Epidemiological Survey. *Actas del 17th World Congress of the International Association of Gerontology*. Vancouver, julio 2001.

- ❖ Goedert MT, Spillantini MGT, Jakes RT, Rutherford DT, Crowther RA. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*; 3:519-526.
- ❖ Gomes I, Collins A, Lonjou C, Thomas NS, Wilkinson J, Watson M, Morton N. (1999). Hardy-Weinberg quality control. *Ann Hum Genet.*; 63(6):535-8.
- ❖ Gómez R, Magaña JJ, Cisneros B, Pérez-Salazar E, Faugeron S, Véliz D, Castro C, Rubio J, Casas L, Valdés-Flores M. (2007). Association of the estrogen receptor a gene polymorphisms with osteoporosis in the Mexican population. *Association. Clin Genet.*; 72(6):574-81.
- ❖ Gong CX, Liu F, Wu G, Rossie S, Wegiel J, Li L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2004). Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. *Journal of Neurochemistry*; 88: 298–310
- ❖ Goode B, Denis P, Panda D, Radeke M, Miller H, Wilson L, Feinstein S. (1997). Functional interactions between the proline rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding assembly. *Mol Biol Cell* 8: 353–365.
- ❖ Goryunov D, Liem RK. (2007). CHIP-ping away at tau. *The Journal of Clinical Investigation*; 117(3):590-2.
- ❖ Goudet J (2002). FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.2.
- ❖ Grune T, Botzen D, Engels M, Voss P, Kaiser B, Jung T, Grimm S, Ermak G, Davies KJ. (2010). Tau protein degradation is catalyzed by the ATP/ubiquitin-independent 20S proteasome under normal cell conditions. *Arch Biochem Biophys.*; 500(2):181-8.
- ❖ Haass C, Mandelkow E. (2010). Fyn-tau-amyloid: a toxic triad. *Cell.* 6; 142(3): 356-8.
- ❖ He P, Shen Y. (2009). Interruption of β -Catenin Signaling Reduces Neurogenesis in Alzheimer's Disease. *J Neurosci.*; 29(20):6545-57.
- ❖ Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Ávila J. (2009). The role of GSK3 in Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin*; 80:248-250.

- ❖ Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Ávila J. (2010). GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Experimental Neurology*; 223:322–325
- ❖ Heyman A, Wilkinson W, Hurwitz J, et al. (1987). Early-onset Alzheimer's disease: clinical predictors of Alzheimer. *Neurology*; 37:980-984.
- ❖ Hoenicka J. (2006). Genes de la Enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*; 42(5): 302-305.
- ❖ Hofman, A, Rocca W, Brayne C. et al. (1991). The Prevalence of Interdementia in Europea Collaborative Study of the 1980-1990 Findings. *International Journal of Epidemiology*; 20: 736-48.
- ❖ Hooper C, Killick R, Lovestone S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*; 104:1433-1439.
- ❖ Hsu WC, Wang HK, Lee LC, Fung HC, Lin JC, Hsu HP, Wu YR, Ro LS, Hu FJ, Chang YT, Lee-Chen GJ, Chen CM. (2008). Promoter polymorphisms modulating HSPA5 expression may increase susceptibility to Taiwanese Alzheimer's disease. *J Neural Transm.*; 115(11):1537-43.
- ❖ Illán I, Górriz, J, Ramírez J, Salas-Gonzalez D, López M, Segovia F, Padilla P, Puntonet C. (2010). Projecting independent components of SPECT images for computer aided diagnosis of Alzheimer's disease. *Pattern Recognition Letters*; 31, I 11, 1342-1347.
- ❖ Inestrosa NC, Toledo EM. (2008). The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurodegeneration*; 3(9): 1-13.
- ❖ Iniesta R, Guinó E, Moreno V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.*;19(4):333-41.
- ❖ Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. (2001). Replication validity of genetic association studies. *Nature Genetics*; 29(3):306-9.
- ❖ Ioannidis JP, Boffetta P, Little J, O'Brien TR, Uitterlinden AG, Vineis P, Balding DJ, Chokkalingam A, Dolan SM, Flanders WD, Higgins JP, McCarthy MI, McDermott DH, Page GP, Rebbeck TR, Seminara D, Khoury MJ. (2008). Assessment of cumulative evidence on genetic associations: interim guidelines. *Int. J. Epidemiol.*; 37(1):120-32.

- ❖ Ittner LM, Götz J. (2011) Amyloid- β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Neuroscience*; 12(2):65-72.
- ❖ Jinwal UK, Koren J, O'Leary JC, Jones JR, Abisambra JF, Dickey CA. (2010). Hsp70 ATPase Modulators as Therapeutics for Alzheimer's and other Neurodegenerative Diseases. *Mol Cell Pharmacol.*; 2(2): 43–46.
- ❖ Johnson G, Stoothoff W. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*; 117: 5721-5729.
- ❖ Kamboh M. (2004). Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet*; 68:381–404.
- ❖ Khan, T.K., Alkon, D.L. (2010). Early diagnostic accuracy and pathophysiologic relevance of an autopsy-confirmed Alzheimer's disease peripheral biomarker. *Neurobiology of Aging* 31 (6):889-900.
- ❖ Khan MA, Berti L. (2009). Alzheimer's Disease Affects Progenitor Cells through Aberrant β -Catenin Signaling. *J Neurosci.*; 29(40):12369-71.
- ❖ Kraepelin E. (1910). Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte- II Band, Klinische Psychiatrie. Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig.
- ❖ Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.*; 27(2-3):95-125.
- ❖ Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR. (2005). GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol.*; 58(6):829-39.
- ❖ Kwok JB, Loy CT, Hamilton G, Lau E, Hallupp M, Williams J, Owen MJ, Broe GA, Tang N, Lam L, Powell JF, Lovestone S, Schofield PR. (2008) Glycogen synthase kinase-3beta and tau genes interact in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*; 64(4):446-54.
- ❖ Laws SM, Friedrich P, Diehl-Schmid J, Müller J, Eisele T, Bäuml J, Förstl H, Kurz A, Riemenschneider M. (2006). Fine mapping of the MAPT locus using quantitative trait analysis identifies possible causal variants in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*; 12(5):510-7.

- ❖ Lee G, Cowan N, Kirshner M. (1988). The primary structure and heterogeneity from mouse brain. *Science*; 239:285-288.
- ❖ Lehmann DJ, Wiebusch H, Marshall SE, Johnston C, Warden DR, Morgan K, Schappert K, Poirier J, Xuereb J, Kalsheker N, Welsh KI, Smith AD. (2001). HLA class I, II & III genes in confirmed late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*; 22(1):71-7.
- ❖ Lewis CM. (2002). Genetic association studies: Design, analysis and interpretation. *Briefings in Bioinformatics*; 3(2): 146–153.
- ❖ Libre J, Ferri C, Acosta D, Guerra M, Huang Y, Jacob K et al. (2008). Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population based cross-sectional survey. *Lancet*; 9; 372(9637):464-74.
- ❖ Liou YC, Sun A, Ry, A, Zho, XZ, Yu ZX, Huang HK, Uchida T, Bronson R, Bing G, Li X, Hunter T, Lu KP. (2003). Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature*; 424: 556–561.
- ❖ Lisker R, Ramirez E, Briceño RP, Granados J, Babinsky V. (1990). Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum. Biol.*;62(6):791-801.
- ❖ Lu Q, Kanamury R, Wood J. (1994). Abnormal phosphorylation of Tau Associated with Bovine Brain Microtubules: Activation by Excess ATP and Dephosphorylation. *J Neurosci Res*; 37:759-768.
- ❖ Ludovic M, Xenia L, Faraj T. (2011). Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*; 58: 458–471.
- ❖ Lunetta KL. (2008). Genetic Association Studies. *Circulation*; 118: 96-101.
- ❖ Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST. (2008). Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem.*; 283(14):9359-68.
- ❖ Mahley R. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*; 240, (4852): 622-630.

- ❖ Mahley R, Rall S. (2000). Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*; 1: 507-537.
- ❖ Martínez-Fierro ML, Beuten J, Leach RJ, Parra EJ, Cruz-Lopez M, Rangel-Villalobos H, Riego-Ruiz LR, Ortiz-Lopez R, Martinez-Rodriguez HG, Rojas-Martinez A. (2009). Ancestry informative markers and admixture proportions in northeastern Mexico. *AIMs and admixture proportions in northeastern Mexico. J Hum Genet.*; 54(9):504-9.
- ❖ Mateo I, Infante J, Llorca J, Rodríguez E, Berciano J. (2006). Association between glycogen synthase kinase-3beta genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* ; 21(4):228-32.
- ❖ Matthias S, Carsten S, Walter R, Chen X, Marcus F, Nikolaus G. (2010). Comparison of Alzheimer A β (1– 40) and A β (1– 42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures. *PNAS*; 106 (47): 19813–19818.
- ❖ Mateo I, Infante J, Llorca J, Rodríguez E, Berciano J, Combarros O. (2006). Association between glycogen synthase kinase-3b genetic polymorphism and late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.*; 21:228 –232.
- ❖ Matus A. (1988). Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci*; 11: 29–44.
- ❖ McDonald BT, Tamai K, He X. (2009) Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*; 17(1): 9–26.
- ❖ McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*; 34(7): 939-44.
- ❖ Mena R, Luna J, García F., Sierra M., Hernández A. (2003) Histopatología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Digital Universitaria "UNAM"*; 4(7): 1-12.
- ❖ Meraz M., Lira K, Campos V, De Anda M, Mena R. (2010). Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem*; 112: 1353–1367.

- ❖ Mines MA, Beurel E, Jope RS. (2011). Regulation of Cell Survival Mechanisms in Alzheimer's Disease by Glycogen Synthase Kinase-3. *International Journal of Alzheimer's Disease*; 2011:861072.
- ❖ Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Santa-Maria I, Mena R, Binder LI, Avila J, Smith MA, Perry G, García-Sierra F. (2008). Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *International Journal of Experimental Pathology*; 89(2):81-90.
- ❖ Morán M, Cebrián J, Gómez-Ramos P, Madero S, Mufson E. (1992) Diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Valoración de las placas seniles de tipo difuso. *Medicina Clínica*; 98(1):19-23.
- ❖ Morales I, Farias G, Maccioni RB (2010). Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation*; 17:202-204.
- ❖ Morelli L, Bulloj A, Leal MC, Castaño EM. (2005) Amyloid β Degradation: A Challenging Task for Brain Peptidases *Subcellular Biochemistry*; 38: 129-145
- ❖ Morishima M, Kosik K. (1996). The pool of MAP kinase associated with microtubules is small but constitutively active. *Molecular Biology of the Cell*; 7: 893-905.
- ❖ Mukherjee O, Kauwe JS, Mayo K, Morris JC, Goate AM. Haplotype-based association analysis of the MAPT locus in late onset Alzheimer's disease. *BMC Genet.*;8:3
- ❖ Muyliaert D, Kremer A, Jaworski T, Borghgraef P, Devijver H, Croes S, Dewachter I, Van Leuven F. (2008). Glycogen synthase kinase-3 β , or a link between amyloid and tau pathology? *Genes Brain Behavior*; 7(1):57-66.
- ❖ Myatt, M. (1994) *Getting started Epi-Info version 6*. Brixton Books, London.
- ❖ Myers A, Kaleem M, Marlowe L, Pittman A, Lees A, Fung H, Duckworth J, Leung D, Gibson A, Morris C, De Silva R, Hardy J. (2005) The H1c haplotype at the MAPT locus is associated with Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*; 14, 16: 2399-2404.
- ❖ Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. (2003). Triple-transgenic model of

Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*; 39:409–421.

- ❖ Pagani L, Eckert A. (2011) Amyloid-Beta Interaction with Mitochondria. *International Journal of Alzheimer's Disease*; 2011: 925050.
- ❖ Pearl LH, Prodromou C. (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.*; 75, 271–294.
- ❖ Pearl LH, Prodromou C, Workman P. (2008). The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochemistry. Journal.* 410: 439–453.
- ❖ Pearson R, Esiri M, Hiorns R, Wilcock G, Powell T. (1985) Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 82(13): 4531-4.
- ❖ Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E., Iqbal K., Grundke-Iqbal I. (1997). “Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain,” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*; 56 (1): 70-78.
- ❖ Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF. (1999). Distribution of active glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*; 58(9):1010–1019.
- ❖ Pei JJ, Khatoon S, An WL, Nordlinger M, Tanaka T, Braak H, Tsujio I, Takeda M, Alafuzoff I, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2003). Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathology*; 105(4):381-92.
- ❖ Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge G. (2007). LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron*; 53:703–717.
- ❖ Perry E, Atack J, Perry R, Hardy J, Dodd P, Edwardson J, Blessed G, Tomlinson B, Fairbairn A. (1984) Intralaminar neurochemical distributions in human midtemporal cortex: comparison between Alzheimer's disease and the normal. *J Neurochem*; 42(5):1402-10.

- ❖ Petrucelli L, Dickson D, Kehoe K, Taylor J, Snyder H, Grover A, De Lucia M, McGowan E, Lewis J, Prihar G, Kim J, Dillmann WH, Browne SE, Hall A, Voellmy R, Tsuboi Y, Dawson TM, Wolozin B, Hardy J, Hutton M. (2004). CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Human Molecular Genetics*; 13(7):703-14.
- ❖ Pittman AM, Myers AJ, Abou-Sleiman P, Fung HC, Kaleem M, Marlowe L, Duckworth J, Leung D, Williams D, Kilford L, Thomas N, Morris CM, Dickson D, Wood NW, Hardy J, Lees AJ, de Silva R. (2005). Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J. Med. Genet.*; 42:837–846.
- ❖ Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*; 155(2): 945-59.
- ❖ Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P. (2000). Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet.*; 67(1):170-81.
- ❖ Quintana J. (2002). Neuropsiquiatría: PET y SPECT. *Rev. Chil. Radiol*; 8(2), 63-69.
- ❖ Quintanilla RA, Dolan PJ, Jin YN, Johnson GV. (2011). Truncated tau and A β cooperatively impair mitochondria in primary neurons. *Neurobiology of Aging*. Article in press.
- ❖ Rademakers R, Cruts M, Van Broeckhoven C. (2003). Genetics of early-onset Alzheimer dementia. *Sci World J*; 3:497-519.
- ❖ Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. (2002). Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci.*; 99:6364–6369.
- ❖ Reisberg B. (2006). Diagnostic criteria in dementia: a comparison of current criteria, research challenges, and implications for DSM-V. *J Geriatr Psychiatry Neurol*; 19(3):137-46.
- ❖ Rial-Boubeta A, Varela-Mallou J. (2008). Estadística práctica para la investigación en Ciencias de la Salud. Netbiblo, SL, España. 308-310 p.
- ❖ Rodríguez-Esparragón F, Rodríguez-Pérez JC, García-Bello MA. (2009). Guía práctica a los estudios de asociación genética. Consideraciones sobre su utilidad clínica. *Nefrología*; 29(6):582-588.

- ❖ Rogaev E, Sherrington R, Rogaeva E, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*; 376:775-8.
- ❖ Romas S, Santana V, Williamson J, Ciappa A, et al. (2002) Familial Alzheimer disease among Caribbean Hispanics: a reexamination of its association with APOE. *Arch Neurol*; 59:87-91.
- ❖ Sahara N, Maeda S, Yoshiike Y, Mizoroki T, Yamashita S, Murayama M, Park JM, Saito Y, Murayama S, Takashima A. (2007). Molecular chaperone-mediated tau protein metabolism counteracts the formation of granular tau oligomers in human brain. *Journal of Neuroscience Research*; 85:3098-3108
- ❖ Sakono M, Zako T. (2010) Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J.*; 277(6):1348-58.
- ❖ Salcedo-Tello P, Ortiz-Matamoros A, Arias C. (2011). GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. *International Journal of Alzheimer's Disease*; 2011: 12 p.
- ❖ Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Hiltunen M, Soininen H. (2011). Hsp90 regulates tau pathology through co-chaperone complexes in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.*; 93(1):99-110.
- ❖ Selkoe D. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*; 399 (Suppl 6738): A23-31.
- ❖ Selkoe D. (2001) Alzheimer's disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev*; 81:741-766.
- ❖ Setó-Salvia N, Clarimón J. Genética en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 2010; 50: 360-4.
- ❖ Sevilla SD. (2007). Metodología de los estudios de asociación genética. *Insuficiencia cardiaca*; 2(3):111-114.
- ❖ Simón A, Frechilla D, Del Río J. (2010). Perspectivas sobre la hipótesis de la cascada del amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*; 50: 667-75.

- ❖ Slatkin M. (2008). Linkage disequilibrium-- understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*; 9(6):477-85.
- ❖ St. George P, Haines J, Farrer L, Polinsky R, Van Broeckhoven C, Goate A, et al. (1990) Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder. FAD Collaborative Study Group. *Nature*; 347: 194-7.
- ❖ Stonnington, C, Chu C, Klöppe, S, Jack, C, Ashburner J, Frackowiak R. (2010). Predicting clinical scores from magnetic resonance scans in Alzheimer's disease. *NeuroImage*; 51 (4):1405-1413.
- ❖ Strittmatter W, Saunders A, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen G, Roses A. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci*; 90(5):1977–1981.
- ❖ Spillantini M, Goedert M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *TINS*; 21: 428-33.
- ❖ Spires T, Hannan A. (2007). Molecular mechanisms mediating pathological plasticity in Huntington's disease and Alzheimer's disease. *J Neurochem*; 100:874-872.
- ❖ Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K. (1993). Tau Protein kinase I is essential for amyloid β -protein-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 90(16):7789–7793.
- ❖ Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, Murayama O, Murayama M, Ishiguro K, Yamaguchi H. (1998). Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neuroscience Research*; 31(4):317–323.
- ❖ Tosuna D, Schuffa N, Truran-Sacreya D, Shawc L, Trojanowskic J, Aisend P., Petersone R, Weinera M. (2010). Relations between brain tissue loss, CSF biomarkers, and the ApoE genetic profile: a longitudinal MRI study. *Neurobiol Aging*; 31(8):1340-54.

- ❖ Trikalinos TA, Salanti G, Khoury MJ, Ioannidis JP. (2006). Impact of violations and deviations in HardyWeinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am J Epidemiol.*; 163(4):300-9.
- ❖ Vignal A, Mila, D, Sancristobal M, Egge, A. (2002). "A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics". *Genetics, selection, evolution: GSE* 34 (3): 275–305.
- ❖ Villalpando-Berumen JM, Mejia-Arango S, Aguilar-Salinas CA, Ordonez-Sanchez ML, Gutierrez-Robledo LM. (2008). Apolipoprotein E epsilon4, Alzheimer's disease, and cognitive performance in elderly Mexican Mestizos. *J Am Geriatr Soc*; 56(4):677-82.
- ❖ Wang HY, D'Andrea MR, Nagele RG. (2002) Cerebellar diffuse amyloid plaques are derived from dendritic A β 42 accumulations in Purkinje cells. *Neurobiol. Aging*; 23:213-223.
- ❖ Wang J. Z. and Liu F. (2008) Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog. Neurobiol.* 85: 148–175.
- ❖ Wang Y, Martinez-Vicente M, Krüger U, Kaushik S, Wong E, Mandelkow EM, Cuervo AM, Mandelkow E. (2009). Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Human Molecular Genetics*, 2009, Vol. 18, No. 21 4153–4170.
- ❖ Weiner, HL Frenkel D. (2006). Immunology and immunotherapy in Alzheimer's disease. *Nature Rev Immunol.*; 6:404-16.
- ❖ Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet.*; 76(5):887-93.
- ❖ Wischik C, Novak M, Edwards P, Klug A, Tichelaar W, Crowther R. (1988). Structural characterization of the core of paired helical filament of Alzheimer disease. *Pro. Natl Acad Sci*; 85:4884–4888.
- ❖ Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB. (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science*; 293:711–714.
- ❖ Wyszynski DF. (1998). La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 3:1.

- ❖ Yang Y, Turner RS, Gaut JR. (1998). The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Aβ40 and Aβ42 secretion. *J Biol Chem*; 273:25552–25555.
- ❖ Yen SS. (2011). Proteasome degradation of brain cytosolic tau in Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Pathol.*; 4(4):385-402.
- ❖ Zhang N, Yu JT, Yang Y, Yang J, Zhang W, Tan L (2011). Association analysis of GSK3B and MAPT polymorphisms with Alzheimer's disease in Han Chinese. *Brain Res.*; 1391:147-53.
- ❖ Zhao WQ, Townsend M. (2009). Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1792:482–496.
- ❖ Zheng H, Koo E. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular Neurodegeneration*; 1(5): 12-1.

Referencias electrónicas:

- ❖ <http://www.ahaf.org/alzdis/about/adabout.htm>
- ❖ <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>
- ❖ <http://www.alzgene.org>
- ❖ <http://www.ahaf.org/alzheimers/about/understanding/brain-nerve-cells.html>
- ❖ <http://www.alzgene.org/TopResults.asp>
- ❖ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- ❖ <http://www.salimetrics.com/dna-analysis/snp-genotyping.php>
- ❖ <http://uvigen.fcien.edu.uy/utem/Popgen/speccases.html>
- ❖ <http://www.dorak.info/genetics/popgen.html>
- ❖ <http://www.alzgene.org/geneoverview.asp?geneid=232>

Anexo I. Hoja de consentimiento informado, del protocolo registrado en el INNN.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ



HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Evaluación de Polimorfismos en el Complejo Gama Secretasa y su Asociación con la Enfermedad de Alzheimer, Demencia Vascular y Demencia Mixta”,

INVESTIGADORES RESPONSABLES:

Dra. Victoria Campos Peña* Dra. Ana Luisa Sosa Ortiz** Dr. Marco Antonio Meraz Ríos***

* Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, INNN

** Laboratorio Clínico de Enfermedades Neurodegenerativas, INNN

*** Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Propósito de Estudio:

El propósito de este estudio es determinar aquellos marcadores moleculares que estén relacionados con el desarrollo de las demencias y diseñar mediante el manejo de técnicas moleculares, estrategias que ayuden al diagnóstico de manera más eficiente y certera.

Procedimiento:

Se llevarán a cabo la toma de muestras de sangre, para la extracción del material genético que será empleado para la genotipificación y desarrollo del perfil genómico de la población.

Confidencialidad:

Los datos obtenidos de este estudio serán estrictamente confidenciales y su uso es únicamente de carácter científico.

Derecho a abandonar:

El o la paciente queda en absoluta libertad para abandonar el estudio en cualquier momento que lo decidan, sin que ello repercuta en la atención clínica.

Después de ser informado (a) y no tener ninguna duda al respecto del protocolo de investigación, autorizo la colección de la muestra de sangre y las pruebas de evaluación neuropsicológica.

Nombre y Firma Paciente

Nombre y firma Testigo

Nombre y firma

Investigador responsable

Basado en Normas éticas para Investigaciones Biomédicas con humanos. Organización Panamericana de la Salud OMS, 1996 (OPS publicaciones científicas).

Anexo II. Pacientes con Enfermedad de Alzheimer incluidos en el estudio.

CLAVE	EDAD	SEXO	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA	CLAVE	EDAD	SEXO	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA
A1	65	F	H. GENERAL DE M.	A26	61	M	H. C. MILITAR
A2	82	M	H. GENERAL DE M.	A27	63	F	H. LA RAZA
A3	61	F	H. GENERAL DE M.	A28			
A4	62	M	H. GENERAL DE M.	A29			
A5	83	M	H. GENERAL DE M.	A30			
A6	76	F	H. GENERAL DE M.	A31			
A7	65	F	H. GENERAL DE M.	A32			
A8	65	F	H. GENERAL DE M.	A33	67	M	H. GENERAL DE M.
A9	85	F	H. GENERAL DE M.	A34	100	F	ANGELES MOCEL
A10	68	F	H. GENERAL DE M.	A35		F	DOMICILIO
A11	81	M	H. GENERAL DE M.	A36	89	F	ANGELES MOCEL
A12	75	M	H. GENERAL DE M.	A37	82	M	ANGELES MOCEL
A13	80	F	H. GENERAL DE M.	A38		F	H. JUAREZ DE MEX.
A14	67	F	H. GENERAL DE M.	A39	84	F	ANGELES MOCEL
A15	76	F	H. GENERAL DE M.	A40	84	M	ANGELES MOCEL
A16	64	F	H. GENERAL DE M.	A42	89	F	H. JUAREZ DE MEX.
A17	65	F	H. GENERAL DE M.	A43	73	M	H. JUAREZ DE MEX.
A18	75	M	H. GENERAL DE M.	A44	79		FRAY BERNARDINO
A19	81	F	H. GENERAL DE M.	A45	70	M	GABRIEL MANCERA
A20	70	F	H. GENERAL DE M.	A46	85	F	FRAY BERNARDINO
A21	74	F	INN	A47	83	F	H. JUAREZ DE MEX.
A22	72	F	H. C. MILITAR	A48	70	M	INN
A23	66	M	INN	A49	91	M	ANGELES MOCEL
A24	65	F	INN	A50	69	M	INN
A25	89	M	INN	A51	68	F	INN

Anexo III. Controles sanos incluidos en el estudio.

CLAVE	EDAD	SEXO	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA	CLAVE	EDAD	SEXO	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA
C1	75	F	H. GENERAL DE M.	C26	75	F	CINVESTAV
C2	63	F	H. GENERAL DE M.	C27	81	M	CINVESTAV
C3	61	F	H. GENERAL DE M.	C30	76	F	NUTRICION
C4	68	F	H. GENERAL DE M.	C31	71	M	NUTRICION
C5	67	M	H. GENERAL DE M.	C32	70	F	NUTRICION
C6	79	F	H. GENERAL DE M.	C33	69	F	NUTRICION
C7	73	M	H. GENERAL DE M.	C34	89	F	NUTRICION
C8	68	M	H. GENERAL DE M.	C35	75	F	NUTRICION
C9	75	F	H. GENERAL DE M.	C36	86	M	NUTRICION
C10	67	F	H. GENERAL DE M.	C37	87	M	NUTRICION
C11	75	F	H. GENERAL DE M.	C38	86	M	NUTRICION
C12	67	M	H. GENERAL DE M.	C39	91	F	NUTRICION
C13	75	F	H. GENERAL DE M.	C40	80	M	NUTRICION
C14	61	M	H. GENERAL DE M.	C41	76	F	NUTRICION
C15	68	M	H. GENERAL DE M.	C42	82	F	NUTRICION
C16	68	M	H. GENERAL DE M.	C43	87	F	NUTRICION
C17	73	F	H. GENERAL DE M.	C45	85	F	NUTRICION
C18	69	M	H. GENERAL DE M.	C46	80	M	NUTRICION
C19	73	F	H. GENERAL DE M.	C47	71	F	NUTRICION
C20	66	F	H. GENERAL DE M.	C48	90	M	NUTRICION
C21	75	M	INN	C49	81	F	NUTRICION
C22	74	M	H. C. MILITAR	C52	77	M	NUTRICION
C23	69	F	INN	C53	67	F	DOMICILIO
C24	65	F	INN	C56	75	M	INN
C25	66	M	INN	C57	70	F	INN

Anexo IV. Población abierta incluida en el estudio.

CLAVE	EDAD	SEXO	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA	CLAVE	EDAD	SEXO	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA
PA1	23	F	INNN	PA29	31	F	CINVESTAV
PA2	48	F	INNN	PA30	28	F	CINVESTAV
PA3	19	M	INNN	PA31	27	F	CINVESTAV
PA4	22	F	INNN	PA32	30	M	CINVESTAV
PA5	30	M	INNN	PA33	25	F	CINVESTAV
PA6	28	M	INNN	PA34	23	F	CINVESTAV
PA7	34	F	INNN	PA35	46	M	INNN
PA8	30	F	INNN	PA36	33	F	INNN
PA9	53	F	INNN	PA37	33	F	INNN
PA10	35	F	INNN	PA38	18	F	INNN
PA11	23	F	INNN	PA39	44	F	INNN
PA12	28	F	INNN	PA40	40	M	INNN
PA13	29	F	INNN	PA41	14	F	INNN
PA15	46	F	INNN	PA42	40	F	INNN
PA17	17	M	INNN	PA43	17	F	INNN
PA18	23	M	INNN	PA44	50	M	INNN
PA20	29	F	CINVESTAV	PA45	39	M	INNN
PA21	29	M	CINVESTAV	PA46	14	M	INNN
PA22	44	F	CINVESTAV	PA47	28	M	INNN
PA23	27	F	CINVESTAV	PA48	48	F	INNN
PA24	33	M	CINVESTAV	PA49	45	F	INNN
PA25	28	F	CINVESTAV	PA50	46	F	INNN
PA26	22	F	CINVESTAV	PA51	42	F	INNN
PA27	29	F	CINVESTAV	PA52	39	F	INNN
PA28	36	F	CINVESTAV	PA53	40	M	INNN

Anexo V. Metodología de extracción de ADN mediante kit QIAamp DNA Blood Midi Kit® de QIAGEN.

1. Colocar 200 µl de Proteasa QIAGEN al fondo de un tubo de 15 ml.
2. Adicionar 2 ml de sangre completa.
3. Agregar 2.4 ml de Buffer AL. Tapar el tubo e invertirlo por 15 veces y agitarlo por 1 min. en el vortex.
4. Incubar durante 4 min. a 70 °C.
5. Agregar 2 ml de Etanol al 100%, tape el tubo e inviértalo 10 veces. Agitar vigorosamente en el vortex.
6. Transferir cuidadosamente la mitad de la mezcla anterior a una columna QIAamp Midi®, previamente colocada en un tubo de 15 ml. Cerrar el tubo y centrifugarlo a 3000 rpm durante 3 min.
7. Retire la columna, deseche el filtrado y coloque de nuevo la columna en el tubo. Agregue la otra mitad de la mezcla del paso número 5. Cierre el tubo y centrifugue a 3000 rpm durante 3 min.
8. Remueva la columna, descarte el filtrado y vuelva a colocar la columna en el tubo.
9. Adicione cuidadosamente al fondo de la columna, 2 ml del Buffer AW1. Tape el tubo y centrifugue a 5000 rpm durante 1 min.
10. Agregue 2 ml de Buffer AW2 al fondo de la columna, cuidando de no romper la. Cierre el tubo y centrifugue a 5000 rpm durante 15 min.
11. Cambie la columna a un tubo nuevo de 15 ml y deseche el que contiene el filtrado de los Buffer.
12. Pipetear 300 µl de agua destilada a la columna. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente centrifugue a 5000 rpm durante 2 min.
13. Recoger con una pipeta el filtrado y depositarlo nuevamente en la columna. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Centrifugar a 5000 rpm durante 2 min.
14. Agregar cuidadosamente 200 µl de agua destilada al fondo de la columna. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Centrifugar a 5000 rpm durante 2 min.
15. Desechar la columna, retirar el filtrado y repartirlo en dos tubos eppendorff de 1 ml. Agitarlos en vortex.
16. Tomar 1 µl del filtrado y cuantificarlo. Realizar una dilución de 10 ng/ml. Guardar el resto de material genético en el congelador (-20 °C).

Anexo VI. Resultados de genotipificación de 9 SNP en 50 pacientes con EA.

CLAVE	GENOTIPO POR POLIMORFISMO								
	MAP1	MAP2	MAP 3	MAP4	MAP5	HS1	HS2	GS1	GS2
A1	AG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A2	AA	AG	CT	AG	GG	CC	TT	AA	AA
A3	AG	AG	CT	AG	GG	CC	TT	AA	AA
A4	GG	AA	CC	GG	AG	CC	TT	AG	AG
A5	AA	AG	CC	AG	AG	CC	TT	AA	AA
A6	AA	GG	CC	AA	GG	CC	CC	AA	AA
A7	AG	AA	CT	GG	GG	CT	TT	AG	AG
A8	AG	AA	CC	AA	AG	CT	TT	AA	AG
A9	GG	AG	CC	AG	AG	CT	TT	AA	AA
A10	AG	GG	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A11	AG	AG	CT	GG	GG	CT	TT	AA	AG
A12	GG	AA	CT	GG	GG	CT	CT	AA	AG
A13	AG	AA	CC	AG	GG	CT	TT	AG	AG
A14	AG	AG	CT	AA	GG	CT	TT	AA	AA
A15	GG	AA	CC	AG	GG	CC	TT	AA	AA
A16	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A17	GG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A18	AG	AG	CC	AA	GG	CC	TT	GG	GG
A19	AG	AG	CC	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A20	GG	GG	CC	AA	GG	CT	TT	AA	AA
A21	AG	AA	CC	AA	AG	CT	TT	AG	AG
A22	AG	AG	CC	AG	GG	CT	TT	AA	AA
A23	AG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A24	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A25	GG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A26	AG	AG	CC	GG	GG	CC	TT	AA	AG
A27	GG	AA	CC	GG	GG	CC	TT	AG	AG
A28	AA	AG	CT	GG	GG	CT	TT	AG	AG
A29	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A30	GG	AA	CT	GG	GG	CT	TT	AA	AA
A31	AG	AG	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A32	GG	AA	CC	AA	GG	CC	TT	AG	AG
A33	AG	GG	CC	GG	GG	CT	TT	AA	AA
A34	AA	GG	CC	AG	GG	CC	TT	AA	AA
A35	GG	AG	CC	AA	AA	CC	TT	AA	AG
A36	AG	AA	CC	AG	GG	CC	CT	AG	AG
A37	AA	AG	TT	GG	GG	CT	TT	AA	AA
A38	GG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AG	AG
A39	GG	AG	CT	GG	AA	TT	TT	GG	GG
A40	GG	AG	CC	AA	GG	CC	TT	GG	GG
A42	GG	AA	CC	AG	AG	CT	TT	AA	AA
A43	AA	GG	CC	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A44	GG	AA	CC	GG	GG	CT	TT	AA	AA
A45	AG	AG	CT	AG	AG	CT	CT	AA	AA
A46	GG	AA	CT	GG	GG	TT	TT	AG	AG
A47	AG	AA	CT	GG	AG	CC	TT	AG	AG
A48	AG	AG	CC	GG	GG	CC	TT	AA	AA
A49	GG	GG	TT	GG	GG	TT	TT	AA	AA
A50	GG	AG	CC	AG	AG	CC	TT	AA	AG
A51	AG	AA	CT	AG	AG	CC	TT	AA	AA

Anexo VII. Resultados de genotipificación de 9 SNP en 50 controles.

CLAVE	GENOTIPO POR POLIMORFISMO								
	MAP1	MAP2	MAP 3	MAP4	MAP5	HS1	HS2	GS1	GS2
C1	AA	AA	CT	GG	AG	CC	TT	AA	AA
C2	AG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
C3	AG	AA	CC	AA	AG	CT	TT	AA	AA
C4	GG	AA	CC	AG	GG	CC	TT	AG	AG
C5	AG	AA	CT	AG	AG	CC	TT	AA	AA
C6	GG	AA	CT	GG	GG	CT	TT	AA	AA
C7	AG	AG	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
C8	GG	AA	CT	GG	AG	CC	TT	AA	AA
C9	GG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
C10	GG	GG	CC	AG	GG	CT	TT	AG	AG
C11	AG	AG	CT	GG	GG	CT	TT	GG	GG
C12	AG	AG	CC	GG	GG	CC	TT	AG	GG
C13	AG	AG	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
C14	GG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
C15	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
C16	AA	GG	CC	GG	GG	CT	TT	GG	GG
C17	AA	GG	TT	GG	GG	CT	TT	AG	AG
C18	GG	AA	CC	AA	GG	CC	TT	AG	AG
C19	AG	GG	CC	AG	GG	CC	TT	AA	AA
C20	AG	AA	TT	GG	GG	CT	TT	GG	GG
C21	AG	AG	CT	GG	GG	CT	TT	AA	AA
C22	AG	AA	CC	GG	AG	CC	TT	GG	GG
C23	GG	AG	CT	GG	GG	CC	CT	AA	AA
C24	AG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
C25	AG	AG	CT	AG	GG	CC	TT	AG	AG
C26	GG	GG	CC	AA	GG	CT	TT	AA	AA
C27	AG	AG	CT	GG	AG	CC	TT	GG	GG
C30	AG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AG	AG
C31	AA	AG	CC	AG	GG	CT	TT	AA	AA
C32	GG	AA	CT	GG	AG	CC	TT	GG	GG
C33	AG	AG	CT	GG	GG	CT	TT	AG	AG
C34	GG	AG	CC	AG	AG	CT	TT	AA	AA
C35	GG	AG	CC	AG	AG	CC	TT	AA	AA
C36	AA	AA	CT	AG	AG	CT	TT	GG	GG
C37	AG	GG	CT	AG	AA	CC	TT	AG	AG
C38	AG	AG	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
C39	AG	AG	CT	AG	GG	CC	TT	AA	AA
C40	AG	AA	CC	AG	AG	CC	TT	AA	AA
C41	AG	AG	CC	AG	GG	CC	TT	GG	GG
C42	GG	AA	CT	AG	GG	CT	TT	AG	AG
C43	GG	AA	CC	AA	GG	CC	TT	AA	AA
C45	AG	AG	CC	AA	AA	CC	TT	AA	AA
C46	AG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AG	AG
C47	GG	AA	CC	AG	GG	CC	TT	AG	AG
C48	AG	AG	CC	AG	GG	CT	TT	AG	AG
C49	AG	AG	CT	AG	GG	CT	TT	GG	AA
C52	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AG	AG
C53	GG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AG	AA
C56	GG	AA	CT	GG	GG	CT	TT	AA	AA
C57	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AG	AG

Anexo VIII. Resultados de genotipificación de 9 SNP en 50 individuos de la población general mexicana.

CLAVE	GENOTIPO POR POLIMORFISMO								
	MAP1	MAP2	MAP 3	MAP4	MAP5	HS1	HS2	GS1	GS2
PA1	GG	AG	CT	AG	AA	CT	CT	AG	AG
PA2	AG	AA	CT	GG	GG	CT	TT	AA	AA
PA3	AG	AG	CC	GG	GG	CC	TT	AA	AA
PA4	GG	AA	CT	AG	GG	CC	TT	AA	AA
PA5	AG	AA	CC	GG	GG	CC	TT	AA	AA
PA6	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
PA7	AG	AA	CT	AG	AG	CC	TT	AG	AG
PA8	AG	AG	CC	GG	GG	CC	TT	AA	AA
PA9	AG	AG	CT	GG	GG	CC	TT	AG	AG
PA10	GG	AG	TT	GG	GG	CT	TT	AG	AG
PA11	AG	AG	CC	AG	AG	CC	TT	AA	AA
PA12	AG	AG	CC	AG	AG	CC	TT	AA	AA
PA13	AA	GG	CC	GG	GG	CT	TT	AA	AA
PA15	AG	AA	CT	GG	AG	CT	TT	AG	AG
PA17	AG	AG	CC	GG	AG	CT	TT	AA	AA
PA18	AA	AG	CT	AG	GG	CC	TT	AG	AG
PA20	AG	AG	TT	GG	GG	CC	TT	AG	AG
PA21	GG	AG	TT	GG	AG	CC	TT	AA	AA
PA22	AG	AG	CC	AG	GG	CC	TT	AA	AA
PA23	GG	AA	CC	GG	AG	CC	TT	AA	AA
PA24	AG	AA	CC	GG	GG	CC	TT	AG	AG
PA25	AG	AG	CC	AG	GG	CC	TT	AA	AA
PA26	GG	AA	CT	GG	AG	CC	TT	AG	AG
PA27	GG	AG	CT	AG	GG	CC	TT	AA	AA
PA28	AG	GG	CC	AG	AG	CC	TT	AA	AA
PA29	AG	AG	CT	AG	GG	CT	TT	AG	AG
PA30	GG	AA	CC	GG	GG	CC	TT	AG	AG
PA31	AA	AA	CT	AA	GG	CC	TT	AG	AG
PA32	AG	AA	CT	GG	GG	TT	CT	AG	AG
PA33	AG	AA	CC	AA	AG	CC	TT	AA	AA
PA34	GG	GG	CC	AG	GG	TT	TT	AG	AG
PA35	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	GG	GG
PA36	GG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
PA37	AA	AA	CT	AG	GG	CC	TT	AG	AG
PA38	GG	AG	CT	AG	AA	CC	TT	AG	AG
PA39	AG	AA	CT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
PA40	AG	AG	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
PA41	AA	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
PA42	GG	AA	CT	GG	GG	CT	TT	AA	AA
PA43	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AG	AG
PA44	AG	AG	CT	GG	AG	CC	TT	AA	AA
PA45	AG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AG	AG
PA46	GG	AA	TT	GG	GG	CC	TT	AA	AA
PA47	GG	AA	CT	GG	GG	CT	TT	AG	AA
PA48	GG	AA	CC	GG	GG	CC	TT	AG	AG
PA49	AA	AG	CT	AG	AG	CT	CT	AG	AG
PA50	GG	AG	CC	AG	GG	CT	CT	AA	AA
PA51	GG	AG	CC	AG	GG	CT	CT	AA	AA
PA52	AG	AG	CC	AA	AG	CC	TT	AG	AG
PA53	AA	AG	CC	AG	AG	CT	CT	AA	AA

Anexo IX. Comparaciones estadísticas de las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados, entre pacientes con Alzheimer (A), Controles (C) y Población Abierta (PA).

rs242557	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	0.7688	0.9200
A vs. C	1.0000	1.0000
C vs. PA	0.7688	0.9200

rs1467967	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	0.5418	1.2100
A vs. C	0.6487	1.1500
C vs. PA	0.8770	1.0500

rs2471738	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	0.2397	0.7100
A vs. C	0.3749	0.7700
C vs. PA	0.7724	0.9200

rs7521	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	0.2688	1.4200
A vs. C	0.5340	1.2100
C vs. PA	0.6273	1.1700

rs3785883	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	0.4415	0.7500
A vs. C	0.8412	0.9200
C vs. PA	0.5686	0.8000

rs2227956	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	0.2900	1.4600
A vs. C	0.2900	1.4600
C vs. PA	1.0000	1.0000

rs391957	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	0.7570	0.8200
A vs. C	0.0981	5.2100
C vs. PA	0.0549	0.1600

rs334558	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	0.2213	1.5400
A vs. C	0.0059	2.5200
C vs. PA	0.1200	0.6100

rs6438552	DIFERENCIA ESTADISTICA	
	p	OR
A vs. PA	1.0000	1.0000
A vs. C	0.1551	1.5800
C vs. PA	0.1551	1.5800

Anexo X. Comparaciones estadísticas de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos estudiados, entre pacientes con Alzheimer (A), Controles (C) y Población Abierta (PA).

	DIFERENCIA ESTADISTICA					
	A/A		A/G		G/G	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	1.0000	1.0000	0.6884	0.8500	0.6868	1.1800
A vs. C	0.5402	1.4700	0.4245	0.7200	0.6868	1.1800
C vs. PA	0.5402	0.6800	0.6903	1.1700	1.0000	1.0000

	DIFERENCIA ESTADISTICA					
	A/A		A/G		G/G	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	1.0000	1.0000	0.4200	0.7200	0.1846	2.5500
A vs. C	0.6906	0.8500	0.8367	1.0900	0.7673	1.1900
C vs. PA	0.6906	1.1700	0.3117	0.6600	0.2969	2.1400

	DIFERENCIA ESTADISTICA					
	C/C		C/T		T/T	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	0.3173	1.5000	0.6818	0.8400	0.4268	0.6500
A vs. C	0.1594	1.7800	0.1088	0.5200	0.7673	1.1900
C vs. PA	0.6818	0.8400	0.2309	1.6300	0.2776	0.5500

	DIFERENCIA ESTADISTICA					
	A/A		A/G		G/G	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	0.1390	2.5200	0.2820	0.6200	1.0000	1.0000
A vs. C	0.2513	1.9800	0.3851	0.6800	1.0000	1.0000
C vs. PA	0.7280	1.2800	0.8347	0.9200	1.0000	1.0000

rs3785883

DIFERENCIA ESTADISTICA						
	A/A		A/G		G/G	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	1.0000	1.0000	0.3513	0.6400	0.3753	1.4900
A vs. C	1.0000	1.0000	0.8070	0.8900	0.8182	1.1100
C vs. PA	1.0000	1.0000	0.4906	0.7300	0.5106	1.3400

rs2227956

DIFERENCIA ESTADISTICA						
	C/C		C/T		T/T	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	0.2969	0.6400	0.3851	1.4700	0.6480	1.5300
A vs. C	0.5364	0.7700	1.0000	1.0000	0.0801	indef
C vs. PA	0.6696	0.8300	0.3851	1.4700	0.1551	0.0000

rs391957

DIFERENCIA ESTADISTICA						
	C/C		C/T		T/T	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	0.3173	indef	0.2969	0.4700	0.5071	1.5700
A vs. C	0.3173	indef	0.3098	3.1300	0.1708	0.2300
C vs. PA			0.0511	0.1500	0.0511	6.6800

rs334558

DIFERENCIA ESTADISTICA						
	A/A		A/G		G/G	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	0.0085	2.1900	0.0009	0.3600	0.1499	0.3200
A vs. C	0.0014	2.5700	0.112	0.6000	0.0661	0.2900
C vs. PA	0.0085	2.1900	0.0009	0.3600	0.1499	0.3200

rs6438552

DIFERENCIA ESTADISTICA						
	A/A		A/G		G/G	
	p	OR	p	OR	p	OR
A vs. PA	0.6868	1.1800	0.4122	0.7100	0.3098	3.1300
A vs. C	0.5465	1.2800	0.5186	1.3200	0.0661	0.2900
C vs. PA	0.8414	0.9200	0.1442	0.5400	0.0079	10.7600

Anexo XI. Combinaciones multiloci encontradas en las muestras estudiadas

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS				FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS			
HAPLOTIPO	ALZHEIMER	CONTROLES	POBLACION ABIERTA	HAPLOTIPO	ALZHEIMER	CONTROLES	POBLACION ABIERTA
AATGGCTAA	7	5	7	GACAGTTGG	0	2	0
GATGGCTAA	19	22	19	GGCGGTTGG	0	2	0
AGCAGCTAA	5	2	0	AGCGGTTGG	0	4	0
GGCAGCTAA	2	5	4	GATGGCTGG	0	9	8
GACGACTAA	2	3	5	AACGGCTGG	0	6	0
GACGGCTGG	16	0	4	GGCGGCTAG	0	1	0
AACAATAA	2	4	2	AGTGGTTGG	0	2	0
AGCGGCTAA	10	7	10	AGCGGTTAA	0	2	2
AGCAGCCAA	2	0	0	GACGACTGG	0	2	0
AATGGTTGG	2	1	0	GATGGCCAA	0	1	0
AACAGTTAG	1	0	0	GGCGGCTAA	0	1	0
GACAATAA	6	0	0	AGCGACTGG	0	1	0
GGCGGTTAA	2	0	2	AACAGTTAA	0	1	0
GGCAATTA	1	0	0	GGCAATAA	0	4	6
GGTGGCTAA	1	0	0	AATAATTGG	0	1	0
AGCGGTTAG	1	0	0	AGTGACTGG	0	1	0
GACGGTCAG	1	0	0	AGTAGTTGA	0	1	0
AACAGTTGG	2	0	0	GACGGCTGA	0	2	0
GATAGTTAA	1	0	0	GATGATCGG	0	0	1
GACAGCTAA	2	6	6	AACGGCTAA	0	0	9
AGCAGCTGG	1	2	0	AATAGCTGG	0	0	5
GACAGCTGG	4	6	0	AACAATGG	0	0	2
GGCAGTTAA	1	3	0	AACAGCTAA	0	0	4
GACGGTTAA	5	5	4	GATGACTGG	0	0	3
AGCGGCTAG	1	0	0	AGTGGCTGG	0	0	4
GGCAACTAG	2	0	0	GGTGGTTGG	0	0	2
AACAGCCGG	1	0	0	AGCGACTAA	0	0	5
AGTGGTTAA	1	0	0	AACGATTGG	0	0	1
GATGATTGG	1	0	0	AGCGATTAA	0	0	1
GGCGATTGG	1	0	0	AACAGCTGG	0	0	3
GGCAGCTGG	1	0	0	GGTGACTAA	0	0	2
AGCAATCAA	1	0	0	GGCAGGTAA	0	0	1
GATGGTTGG	1	0	0	GGCAGTTGG	0	0	2
AACGACTGG	1	0	0	AGCAGTTGG	0	0	1
GGTGGTTAA	2	0	0	AATGGTCGG	0	0	1
AACGACTAA	0	2	0	GACGGTTGA	0	0	1
GACAGTTAA	0	3	0	AATAATCGG	0	0	1
GACGGCTAA	0	11	13	AACAATCAA	0	0	2
AGTGGCTAA	0	7	5	GGCAGTCAA	0	0	2
AGCGGCTGG	0	3	0				

Anexo XII. Diferencias estadísticas de la comparación de combinaciones multiloci

	A vs. C		A vs. P		C vs. P	
	P	OR	P	OR	P	OR
AATGGCTAA	0.5402	1.4700	1.0000	1.0000	0.5402	0.6800
GATGGCTAA	0.5439	0.7800	1.0000	1.0000	0.5439	1.2800
AGCAGCTAA	0.2420	2.6700	0.0224	indef	0.1551	indef
GGCAGCTAA	0.2420	0.3800	0.4020	0.4800	0.7280	1.2800
GACGACTAA	0.6480	0.6500	0.2420	0.3800	0.4632	0.5700
GACGGCTGG	0.0000141	indef	0.0028	5.4100	0.0422	0.0000
AACAATAA	0.4020	0.4800	1.0000	1.0000	0.4020	2.0900
AGCGGCTAA	0.4268	1.5400	1.0000	1.0000	0.4268	0.6500
AGCAGCCAA	0.1551	indef	0.1551	indef	no comp.	no comp.
AATGGTTGG	0.5597	2.0400	0.1551	indef	0.3173	indef
AACAGTTAG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GACAATAA	0.0119	indef	0.0119	indef	no comp.	no comp.
GGCGTTAA	0.1551	indef	1.0000	1.0000	0.1551	0.0000
GGCAATTA	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GGTGGCTAA	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
AGCGGTTAG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GACGGTCAG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
AACAGTTGG	0.1551	indef	0.1551	indef	no comp.	no comp.
GATAGTTAA	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GACAGCTAA	0.1423	0.3100	0.1423	0.3100	1.0000	1.0000
AGCAGCTGG	0.5597	0.4900	0.3173	indef	0.1551	indef
GACAGCTGG	0.5071	0.6400	0.0422	indef	0.0119	indef
GGCAGTTAA	0.3098	0.3200	0.3173	indef	0.0801	indef
GACGGTTAA	1.0000	1.0000	0.7280	1.2800	0.7280	1.2800
AGCGGCTAG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GGCAACTAG	0.1551	indef	0.1551	indef	no comp.	no comp.
AACAGCCGG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
AGTGGTTAA	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GATGATTGG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GGCGATTGG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GGCAGCTGG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
AGCAATCAA	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GATGGTTGG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
AACGACTGG	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
GGTGGTTAA	0.3173	indef	0.3173	indef	no comp.	no comp.
AACGACTAA	0.1551	0.0000	no comp.	no comp.	0.1551	indef
GACAGTTAA	0.0801	0.0000	no comp.	no comp.	0.0801	indef
GACGGCTAA	0.00046	0.0000	0.00012	0.0000	0.6412	0.8000
AGTGGCTAA	0.0063	0.0000	0.0224	0.0000	0.5402	1.4700
AGCGGCTGG	0.0801	0.0000	no comp.	no comp.	0.0801	indef
GACAGTTGG	0.1551	0.0000	no comp.	no comp.	0.1551	indef
GGCGTTGG	0.1551	0.0000	no comp.	no comp.	0.1551	indef
AGCGTTGG	0.0422	0.0000	no comp.	no comp.	0.0422	indef
GATGGCTGG	0.0017	0.0000	0.0033	0.0000	0.7910	1.1500

AACGGCTGG	0.0119	0.0000	no comp.	no comp.	0.0119	indef
GGCGGCTAG	0.3173	0.0000	no comp.	no comp.	0.3171	indef
AGTGTTGG	0.1551	0.0000	no comp.	no comp.	0.1551	indef
AGCGTTAA	0.1551	0.0000	0.1551	0.0000	1.0000	1.0000
GACGACTGG	0.1551	0.0000	no comp.	no comp.	0.1551	indef
GATGGCCAA	0.3173	0.0000	no comp.	no comp.	0.3171	indef
GGCGGCTAA	0.3173	0.0000	no comp.	no comp.	0.3171	indef
AGCGACTGG	0.3173	0.0000	no comp.	no comp.	0.3171	indef
AACAGTTAA	0.3173	0.0000	no comp.	no comp.	0.3171	indef
GGCAACTAA	0.0422	0.0000	0.0119	0.0000	0.5071	0.6400
AATAATTGG	0.3173	0.0000	no comp.	no comp.	0.3171	indef
AGTGACTGG	0.3173	0.0000	no comp.	no comp.	0.3171	indef
AGTAGTTGA	0.3173	0.0000	no comp.	no comp.	0.3171	indef
GACGGCTGA	0.1551	0.0000	no comp.	no comp.	0.1551	indef
GATGATCGG	no comp.	no comp.	0.3173	0.0000	0.3173	0.0000
AACGGCTAA	no comp.	no comp.	0.0017	0.0000	0.0017	0.0000
AATAGCTGG	no comp.	no comp.	0.0224	0.0000	0.0224	0.0000
AACAACTGG	no comp.	no comp.	0.1551	0.0000	0.1551	0.0000
AACAGCTAA	no comp.	no comp.	0.0422	0.0000	0.0422	0.0000
GATGACTGG	no comp.	no comp.	0.0801	0.0000	0.0801	0.0000
AGTGCTGG	no comp.	no comp.	0.0422	0.0000	0.0422	0.0000
GGTGTTGG	no comp.	no comp.	0.1551	0.0000	0.1551	0.0000
AGCGACTAA	no comp.	no comp.	0.0224	0.0000	0.0224	0.0000
AACGATTGG	no comp.	no comp.	0.3173	0.0000	0.3173	0.0000
AGCGATTAA	no comp.	no comp.	0.3173	0.0000	0.3173	0.0000
AACAGCTGG	no comp.	no comp.	0.0801	0.0000	0.0801	0.0000
GGTACTAA	no comp.	no comp.	0.1551	0.0000	0.1551	0.0000
GGCAGGTAA	no comp.	no comp.	0.3173	0.0000	0.3173	0.0000
GGCAGTTGG	no comp.	no comp.	0.1551	0.0000	0.1551	0.0000
AGCAGTTGG	no comp.	no comp.	0.3173	0.0000	0.3173	0.0000
AATGGTCGG	no comp.	no comp.	0.3173	0.0000	0.3173	0.0000
GACGGTTGA	no comp.	no comp.	0.3173	0.0000	0.3173	0.0000
AATAATCGG	no comp.	no comp.	0.3173	0.0000	0.3173	0.0000
AACAATCAA	no comp.	no comp.	0.1551	0.0000	0.1551	0.0000
GGCAGTCAA	no comp.	no comp.	0.1551	0.0000	0.1551	0.0000

indef= indefinido.

no comp.= no comparable.