



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Estudio de asociación genética entre la variante rs6265 del gen BDNF y el desempeño cognitivo en adultos mayores mestizo-mexicanos.**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**Química Farmacéutica Bióloga**

**PRESENTA**

Miriam Inés Cruz Rodríguez

**DIRECTOR DE TESIS**

Dra. Patricia Rojas Castañeda

**ASESOR DE TESIS**

Dra. Raquel Retana Ugalde



Ciudad de México, 2019



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.

*“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas. Ahora sabemos que está en nuestros genes”*

**James Watson**

## **JURADO ASIGNADO.**

Presidente: Mtra. Leonor Aguilar Santelises

Vocal: Dra. Patricia Rojas Castañeda

Secretario: Dra. Raquel Retana Ugalde

Suplente: Q.F.B. Francisco Javier Parada García

Suplente: Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurotoxicología perteneciente al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

Director: Dra. Patricia Rojas Castañeda

Asesor: Dra. Raquel Retana Ugalde

Sustentante: Miriam Inés Cruz Rodríguez

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, mi *alma mater*, es indescriptible el privilegio de pertenecer a ella y portar su escudo.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, por formarme personal y académicamente. Brindarme un camino en el área científica, amistades y experiencias invaluableles.

A mi directora de tesis, la **Dra. Patricia Rojas Castañeda** por su disposición a comentar y guiar mi trabajo, su actitud crítica, además de su apoyo incondicional.

A la **M. en C. Elizabeth Ruíz Sánchez**, por dirigirme en la investigación y escritura de mi tesis. Gracias por permitirme aprender tanto de ti en el laboratorio, siempre en un ambiente de respeto y amistad.

Al **Laboratorio de Neurotoxicología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”**, por todos los consejos, enseñanzas, apoyo y muestras de amistad.

A mi asesora interna, la **Dra. Raquel Retana Ugalde** por su asesoría y apoyo en mi trabajo.

A mis sinodales, la **Mtra. Leonor Aguilar Santelises**, el **Q.F.B. Javier Parada García** y el **Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava** por su cuidadosa lectura y las valiosas observaciones para la versión final de este documento.

## DEDICATORIA

A mis padres, **Leticia y Miguel**, la familia que han formado es la más grande muestra de amor que existe. Me han enseñado todo, son un ejemplo para mí en todos los aspectos. Mi amor por ustedes es infinito, gracias por tanto.

**Brenda**, tu complicidad, amistad y alegría me son imprescindibles. Siempre cuenta con mi amor y apoyo, estoy muy orgullosa de ti. Eres la mejor compañera de vida.

A la memoria de **Gustavo**, fuiste un hermano mayor para mí. Me hubiera encantado que nuestro tiempo juntos fuera más, cada una de nuestras aventuras estarán siempre conmigo. Te extraño cada día.

**Lulio**, mi maifrend, tu amistad cambio todos los aspectos en mi vida. Gracias por tu apoyo estos últimos años, por darme el valor a siempre dar un poco más.

**Conce, Gus, Lau, Ludwin y Alitzel**, después de tantos años se han vuelto mis hermanos, su amistad en algo invaluable.

**Maricruz, Fer, Andrea y Jesús**. Son los mejores amigos que me pudo dar la Química, gracias por siempre estar conmigo.

A todos mis **amigos de la FES-Z**, hicieron que la universidad fuera más divertida y me enseñaron que no pasa nada por despegarse un rato de los libros.

A mi **familia y amigos** que siempre me apoyan, están pendientes de mí y me brindan su amor.

## ÍNDICE

<b>1. LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>4. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
<b>4.1 Envejecimiento .....</b>	<b>8</b>
<b>4.2 Cognición.....</b>	<b>10</b>
4.2.1 Escalas neuropsiquiátricas .....	12
<b>4.3 Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).....</b>	<b>15</b>
4.3.1 Síntesis e isoformas activas de BDNF .....	18
4.3.2 Receptores de BDNF.....	20
<b>4.4 Variantes genéticas .....</b>	<b>22</b>
<b>4.5 Variante rs6265 del gen <i>BDNF</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>4.6 Variante rs6265 y su impacto en los procesos cognitivos humanos ....</b>	<b>24</b>
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>27</b>
<b>6. HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>7. OBJETIVO .....</b>	<b>29</b>
7.1 Objetivos específicos .....	29
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>10. DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>12. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>60</b>
<b>13. REFERENCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>14. ANEXOS .....</b>	<b>70</b>
Anexo 1. Escala MMSE .....	70
Anexo 2. Escala GDS .....	72

## 1. LISTA DE ABREVIATURAS

---

---

<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor; Factor neurotrófico derivado de cerebro
<b>MMSE</b>	Mini-mental state examination; Mini examen del estado mental
<b>HRM</b>	High resolution melting; análisis de disociación en alta resolución
<b>SNV</b>	Single nucleotide variant; Variante de un solo nucleótido
<b>Val</b>	Valina
<b>Met</b>	Metionina
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>GDS</b>	Geriatric depression scale; Escala de depresión geriátrica
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>NGF</b>	Nerve growth factor; Factor de crecimiento nervioso
<b>NT3</b>	Neurotrofina 3
<b>NT4</b>	Neurotrofina 4
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>kDa</b>	KiloDalton

---

---

<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid; Ácido desoxirribonucleico
<b>CDS</b>	Coding DNA sequence; Secuencia de DNA codificante
<b>MMP</b>	Metaloproteasa
<b>p75<sup>NTR</sup></b>	Receptor de neurotrofina p75
<b>Trk</b>	Receptor tirosina-cinasa
<b>nt</b>	Nucleótido
<b>C</b>	Citosina
<b>T</b>	Timina
<b>A</b>	Adenina
<b>G</b>	Guanina
<b>Indel</b>	Variante de inserción-eliminación
<b>kb</b>	Kilobase
<b>SVD-WG</b>	Sequence variant description working group
<b>NMDAR</b>	Receptor ácido N-metil-D-aspártico
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>INNN MVS</b>	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez
<b>INAPAM</b>	Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores
<b>mL</b>	Mililitro
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>BLGR</b>	Solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloruro de amonio
<b>M</b>	Molar (concentración)

---

---

<b>KHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de potasio
<b>mM</b>	Milimolar
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>TTS</b>	Tris tritón sacarosa
<b>μL</b>	Microlitro
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>TE</b>	Tris/EDTA
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>TBE</b>	Tris-borato/Ácido bórico/EDTA
<b>μg</b>	Microgramo
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction; Reacción en cadena polimerasa
<b>min</b>	Minuto
<b>seg</b>	Segundo
<b>HWE</b>	Equilibrio de Hardy-Weinberg
<b>χ<sup>2</sup></b>	Chi-cuadrada
<b>t</b>	t de Student
<b>U</b>	U de Mann-Whitney

---

---

<b>r</b>	Rho de Spearman
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>mg</b>	Miligramo
<b>dL</b>	Decilitro
<b>MAF</b>	Minor allele frequency; Alelo de menor frecuencia

---

---

## 2. RESUMEN

El deterioro cognitivo es un contribuyente importante a la reducción de la calidad de vida que experimentan los adultos mayores y los factores de riesgo genéticos parecen contribuir a la variación de esta más allá de lo relacionado con la edad. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) es una proteína involucrada principalmente en el desarrollo y la plasticidad neural. La presencia de la variante genética rs6265 en el gen *BDNF* se ha relacionado con la disminución de la secreción de la neurotrofina, afectando con esto la cognición. El objetivo de este trabajo fue evaluar la asociación de este polimorfismo y el desempeño cognitivo global en una muestra de adultos mayores mestizo-mexicanos. Cien sujetos (cincuenta hombres y cincuenta mujeres) con edad mínima de 65 años fueron incluidos en este estudio. El Mini examen del estado mental (MMSE, por sus siglas en inglés) se utilizó para evaluar el desempeño cognitivo, estableciendo punto de corte de 24 para descartar un probable deterioro cognitivo. Mientras que la genotipificación se realizó por análisis de disociación en alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés). Los resultados indican que la presencia de la variante rs6265 influye en el dominio cognitivo de comprensión en adultos masculinos ( $p= 0.032$ ). Además, en hombres portadores del alelo A se encontró una correlación positiva fuerte ( $r=0.719$ ) entre la cognición y los años de escolaridad. Este estudio sugiere que el polimorfismo rs6265 podría desempeñar un papel como factor de riesgo asociado con la cognición (particularmente en la comprensión) de población adulta mayor mexicana, corroborando hallazgos previos en otras poblaciones.

### 3. INTRODUCCIÓN

El deterioro cognitivo es un proceso natural durante el envejecimiento, en el que el razonamiento, la memoria, la función ejecutiva y el lenguaje se ven afectados <sup>(1)</sup>. Diversos factores pueden disminuir las capacidades cognitivas en los adultos mayores, sin embargo, se ha señalado que los factores genéticos representan más de un 50% de estas causas <sup>(2, 3)</sup>. Además, algunas variaciones genéticas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y estrés oxidativo, se encuentran entre los candidatos para influir en los procesos cognitivos durante el envejecimiento <sup>(3)</sup>.

El factor neurotrófico derivado de cerebro es una proteína miembro de la familia de las neurotrofinas, la cual desempeña un papel fundamental en la regulación de la diferenciación neuronal y la plasticidad sináptica <sup>(2, 4)</sup>. Recientemente, se ha demostrado que la variante genética rs6265 (Val66Met), un polimorfismo del gen *BDNF* en el humano, reduce la secreción de esta proteína por lo que se ha relacionado con el deterioro de la memoria y la susceptibilidad a trastornos neuropsiquiátricos <sup>(2)</sup>. Esta alteración del *BDNF* es una variante de un solo nucleótido (SNV, por sus siglas en inglés) resultante de la sustitución de una Valina (Val) por una Metionina (Met) en el prodominio de la proteína <sup>(5)</sup>.

La identificación e implicación de la asociación de la SNV rs6265 en la conducta y la cognición en adultos mayores representa un avance en la búsqueda de biomarcadores genéticos <sup>(6)</sup>. El reconocimiento de estos como blancos terapéuticos permitiría el avance en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan la cognición <sup>(7)</sup>. Asimismo se tendrían mejores fundamentos en relación

a enfermedades relacionadas con la demencia. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (EA) <sup>(8)</sup> y la enfermedad de Parkinson (EP) <sup>(9)</sup>, que representan los padecimientos neurodegenerativos con mayor prevalencia a nivel mundial <sup>(10)</sup>.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Envejecimiento

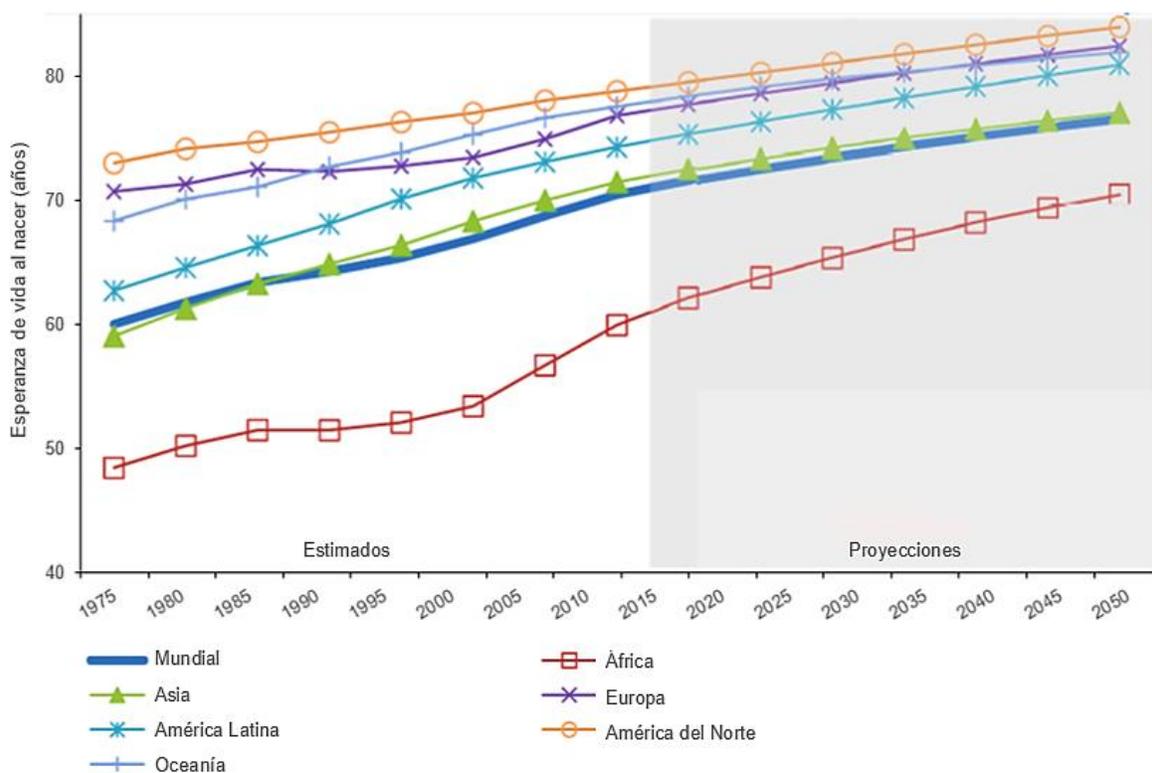
Los cambios que constituyen e influyen en esta etapa de la vida son complejos. Desde el punto de vista biológico, el envejecimiento se relaciona con la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares en el cuerpo. Con el tiempo, estos daños reducen progresivamente las reservas fisiológicas, aumentan el riesgo de muchas enfermedades y disminuyen en general la capacidad del individuo, terminando en la muerte. Estos cambios no son lineales ni uniformes, además de estar fuertemente influenciados por el entorno, el comportamiento, las capacidades físicas y mentales con las que cuenta cada persona <sup>(11)</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al envejecimiento saludable como el proceso de fomentar y mantener la capacidad funcional que permite el bienestar en la vejez <sup>(11)</sup>. Es decir, a pesar de hablar del envejecimiento siendo la última fase de la vida, este estadio puede ser bien aprovechado por el individuo si se promueven las condiciones correctas.

Una vejez sana es de suma importancia debido a la situación mundial actual, la población avanza hacia un proceso acelerado de envejecimiento, la vida promedio de la sociedad está aumentando y lo seguirá haciendo en las décadas por venir. Hoy en día, la mayoría de las personas puede aspirar a vivir más allá de los 60 años <sup>(12)</sup>. En el año 2000 una de cada diez personas en el mundo era un adulto mayor, a mitad de siglo se calcula que una de cada cinco personas lo será <sup>(11)</sup>.

La esperanza de vida mundial (Figura 1) varía según la región por los diversos factores económicos, sociales y ambientales. México durante el periodo de 2005 a 2010 tenía un promedio de vida 75.7 años, mientras que, en la actualidad

(2015-2020) es de 77.4 años y se calcula que para el período de 2045 a 2050 sea de 82.6 años <sup>(12)</sup>.



**Figura 1.** Esperanza de vida al nacer (años) por región: estimaciones 1975-2015 y proyecciones 2015-2050.

Modificado de: Naciones Unidas, Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población <sup>(12)</sup>; por Miriam Inés Cruz Rodríguez (2019)

En los países de ingresos bajos y medianos, incluido el nuestro, el aumento en la esperanza de vida se debe en gran parte a la notable reducción de la mortalidad en las primeras etapas de la vida, sobre todo durante la infancia y el nacimiento, además de la mortandad por enfermedades infecciosas <sup>(13)</sup>. Estos años de vida adicionales y los cambios demográficos que generan tienen repercusiones

para cada uno de nosotros y para las sociedades en que vivimos. La transición demográfica hacia poblaciones de mayor edad que se desarrollará pone a nuestro alcance recursos humanos y sociales, sin embargo, las oportunidades que tendremos al envejecer dependerán en gran medida de algo fundamental: nuestra salud. Actualmente, la salud de las personas mayores no sigue al ritmo con el que aumenta la longevidad, pero la mala salud no tiene que ser la característica predominante y limitante de las poblaciones de edad avanzada <sup>(11)</sup>. Sobre todo, debemos tomar en cuenta que factores ambientales y genéticos han provocado que el aumento en la esperanza de vida no siempre coincida con la vida útil del cerebro <sup>(1)</sup>.

## 4.2 Cognición

Las disminuciones en las capacidades sensoriales y motoras relacionadas con la edad son bastante sencillas de detectar y medir. En contraste, las capacidades cognitivas en declive son procesos complejos. Los componentes de la cognición varían según las tareas que se estudian, la teoría que se utiliza para predecir y explicar cómo las personas realizan esas actividades <sup>(14, 15)</sup>.

De acuerdo con la patología y etiología subyacentes a la declinación cognitiva se diferencia entre los tipos de trastornos neurocognitivos, ya sea mayor (demencia) o leve (deterioro cognitivo). Los subtipos de estos trastornos se distinguen de acuerdo a una combinación de la evolución, dominios afectados y síntomas relacionados. La mayor diferencia entre el trastorno neurocognitivo mayor y leve, se centra en la declinación cognitiva de un nivel de desempeño en uno o más dominios específicos, en el primero este factor es significativo, mientras que en el segundo

esta disminución es moderada. Además, los déficit cognitivos en el trastorno neurocognitivo mayor interfieren con la independencia para realizar las actividades cotidianas, mientras que, en el caso del trastorno neurocognitivo leve los déficit cognitivos que se suelen presentar no lo hacen. En ambos casos, es recomendable tener pruebas neuropsicológicas u otra valoración clínica calificada para su diagnóstico <sup>(16)</sup>.

La mayoría de las habilidades cognitivas disminuyen con la edad y en una población cada vez más envejecida a nivel internacional, el deterioro cognitivo es un problema social y de salud importante <sup>(17)</sup>. El déficit en la cognición no interfiere significativamente con las actividades diarias de las personas que lo padecen. Sin embargo, puede actuar como un nivel transitorio de evolución a demencia con un rango de conversión de 10 a 15% por año <sup>(18)</sup>. Igualmente, el declive cognitivo se asocia con una amplia variedad de condiciones médicas crónicas relacionadas con la edad, por ejemplo: la EA, la diabetes tipo II, enfermedades cerebrovasculares, factores cardiovasculares y desórdenes inflamatorios <sup>(19)</sup>.

El deterioro cognitivo está relacionado con la disminución de la memoria, la velocidad de procesamiento, la atención además de la función ejecutiva más allá de lo esperado por la edad y el nivel educativo <sup>(18, 20)</sup>. Todas las personas varían enormemente en cuanto a qué habilidades se ven afectadas, con qué rapidez y cuánto disminuyen. Parte de esta variabilidad se debe a la genética, las condiciones ambientales, los factores sociales, la dieta, las historias individuales de aprendizaje y experiencia <sup>(1, 2, 14, 15)</sup>. La pérdida cognitiva por el avance de la edad puede ser significativamente menor en un individuo con mayor nivel de educación, con estilo de vida físico activo y dieta balanceada. Esta heterogeneidad a través de la vida

aunado a la diversidad genética, indica la diversidad del desarrollo cognitivo individual <sup>(2, 15)</sup>. Los factores de riesgo genéticos representan el 50% de la variabilidad de la capacidad cognitiva relacionada con la edad en los adultos mayores <sup>(2, 3)</sup>.

En el ámbito genético, lo que se busca es relacionar ciertos genes con enfermedades, rasgos o mecanismos involucrados con la edad. Por ejemplo, la memoria es afectada por el envejecimiento, de ahí que los genes previamente asociados con este dominio cognitivo se han propuesto para ser candidatos en el deterioro cognitivo general. En particular, el gen *BDNF* se ha asociado con el aprendizaje y la memoria, teniendo una disminución constante en su expresión asociada al avance de la edad <sup>(21)</sup>.

#### 4.2.1 Escalas neuropsiquiátricas

##### 4.2.1.1 Escalas de estado de ánimo (Depresión)

La depresión, especialmente entre los adultos mayores, tiene impacto negativo en la cognición <sup>(22)</sup>. Además, varios estudios recientes confirman que esta enfermedad se asocia con mayor riesgo de desarrollar trastorno neucognitivo mayor <sup>(23-25)</sup>.

El diagnóstico de la depresión en los adultos mayores es un problema grave debido al proceso de envejecimiento, las diversas enfermedades que influyen y que pueden ocultar síntomas <sup>(26)</sup>. La evaluación para saber si existe esta enfermedad se realiza por medios clínicos, incluyendo el uso de escalas de estado de ánimo <sup>(22)</sup>. Las escalas utilizadas en los trastornos depresivos funcionan como instrumentos de medida de la gravedad de dicha enfermedad y de su respuesta al tratamiento <sup>(27)</sup>.

#### 4.2.1.1.1 Escala de depresión geriátrica (GDS)

La prueba de GDS (por sus siglas en inglés), creada por Yesavage et al. <sup>(28)</sup>, ha sido probada y utilizada ampliamente con la población de adultos mayores. Las preguntas se centran en el estado de ánimo, especialmente, en la semana previa a la aplicación del examen; el puntaje puede ayudar a los clínicos a decidir si se necesita una evaluación adicional. Existen diferentes versiones de GDS según su número de preguntas, el cuestionario largo GDS es una herramienta breve de 30 puntos, mientras que la versión corta consiste de 15 preguntas. Estas se evalúan por puntaje y según el resultado es el diagnóstico, de 0 a 4 puntos se considera normal, según la edad, educación y quejas; 5 a 8 depresión leve; 9 a 11 depresión moderada; y 12 a 15 depresión severa <sup>(29)</sup>.

#### 4.2.1.2 Escalas cognitivas

Las escalas cognitivas buscan medir de manera objetiva el rendimiento del estado mental del sujeto en una tarea concreta del examen. Por tanto, durante su administración también se atienden aspectos subjetivos que pueden proporcionar información importante. Algunos puntos a considerar pueden ser la atención prestada por la persona, la motivación, el grado de colaboración, la facilidad para comprender las instrucciones y el tiempo necesario para su realización <sup>(30)</sup>.

##### 4.2.1.2.1 Mini examen del estado mental (MMSE)

Desde su creación por Folstein et al <sup>(31)</sup> en 1975 el Minimal State Examination (MMSE) o mini examen del estado mental, es la prueba de rastreo cognitivo más conocida y utilizada actualmente <sup>(30, 32)</sup>. Es un examen que se restringe al

rendimiento cognitivo global y excluye trastornos conductuales o emocionales, generalmente, más difíciles de precisar mediante una evaluación estandarizada breve <sup>(32)</sup>. El MMSE se divide en dos secciones, la primera solo involucra respuestas vocales y la segunda evalúa la capacidad de nombrar, seguir órdenes verbales y escritas, escribir una oración espontáneamente, y copiar un polígono complejo <sup>(31)</sup>.

Una de sus mayores ventajas es que al ser altamente utilizado, gran parte del personal sanitario involucrado en la evaluación de personas con deterioro cognitivo está familiarizado con su uso. Además, se trata de una escala estudiada en diferentes poblaciones y para diferentes funciones. Igualmente, MMSE evalúa más dominios cognitivos que otras pruebas breves: orientación, atención y cálculo, memoria, lenguaje y capacidad visoconstructiva <sup>(31)</sup>.

No obstante, presenta una serie de limitaciones, por ejemplo, su puntuación está influida por las variables sociodemográficas del individuo, como la edad, la educación y la cultura. También tiene el inconveniente de la falta de sensibilidad para detectar fases iniciales de demencia, al solo evaluar funciones ejecutivas, pueden verse afectadas las medidas de capacidad visoespacial, memoria episódica y semántica. Incluso en el caso de la EA, MMSE tiene bajo rendimiento en el tamizado del trastorno neurocognitivo leve, al tener baja capacidad de diferenciarlo de los casos que se presentan en esa enfermedad neurodegenerativa <sup>(30, 32)</sup>. Por último, el tiempo de administración es variable, alrededor de 10 minutos, lo que supone un problema para algunos médicos que consideran que el tiempo de administración es demasiado largo <sup>(30)</sup>.

Estos inconvenientes explican las numerosas versiones y adaptaciones del MMSE, cuyas diferencias cualitativas y cuantitativas afectan la validez del examen

y dificultan la comparación de los resultados obtenidos en diferentes poblaciones (30, 32).

El diagnóstico del deterioro cognitivo es clínico, hasta la fecha, con un papel limitado de los marcadores biológicos. Sin embargo, sabemos que los factores de riesgo genéticos representan alta variabilidad de la capacidad cognitiva relacionada con la edad en los adultos mayores (2,3). Particularmente, un grupo de proteínas llamadas neurotrofinas, son factores de crecimiento con alta importancia a nivel cognitivo, por lo que son considerados factores de riesgo genéticos cuando llegan a presentar alguna variación genética (33).

#### **4.3 Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)**

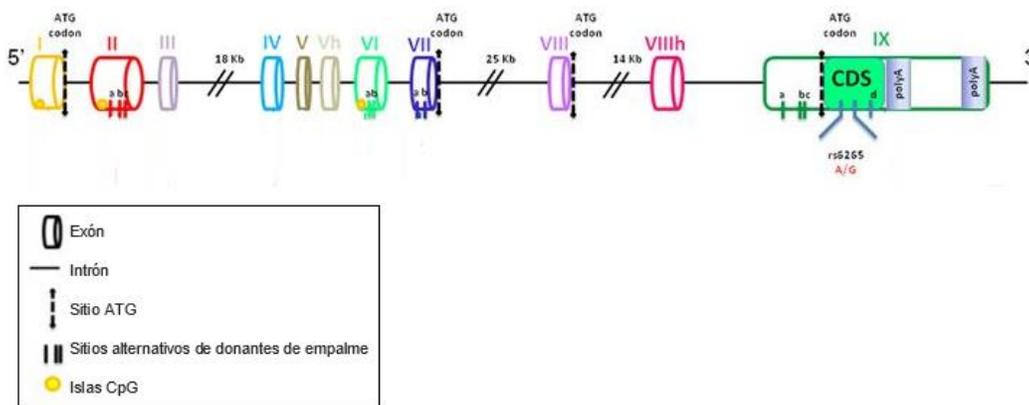
Las neurotrofinas son una familia de proteínas que desempeñan un papel clave en varios procesos biológicos tanto en el sistema nervioso en desarrollo como en el adulto (33). La investigación de las últimas dos décadas ha demostrado que estos factores neurotróficos regulan casi todos los aspectos del desarrollo y la función neuronal, incluida la proliferación y diferenciación celular. Asimismo, intervienen en el crecimiento de axones y dendritas, en la sinaptogénesis, en la función sináptica y en la plasticidad a nivel de sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP) (34, 35).

El grupo de las neurotrofinas está conformado por el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), el BDNF, la Neurotrofina 3 (NT3) y la Neurotrofina 4 (NT4) (35). El primer miembro de la familia de las neurotrofinas, el NGF, se descubrió a principios de la década de 1950, una proteína involucrada en la supervivencia y el crecimiento de las neuronas simpáticas y sensoriales durante el desarrollo. La formación de la

familia de las neurotrofinas se realizó con la identificación del BDNF, el cual demostró efecto neurotrófico similar al NGF en neuronas sensoriales cultivadas y secuencia de aminoácidos altamente homóloga. Desde entonces, se han identificado otras dos neurotrofinas en el cerebro de los mamíferos: la NT3 y la NT4 (34, 35).

La proteína de BDNF comparte aproximadamente el 50% de igualdad de aminoácidos con NGF, NT3 y NT4. Cada neurotrofina consiste en un homodímero unido no covalentemente, con un péptido que sigue al codón de iniciación y una pro-región que contiene un sitio de glicosilación. Inicialmente son producidas las proneurotrofinas (PM ~ 30 kDa), después sufren una escisión y se obtiene la neurotrofina madura (PM ~ 14 kDa). Las isoformas de proneurotrofinas tienen características de unión y actividad biológica distinta a las neurotrofinas maduras (36).

El factor neurotrófico, BDNF, es codificado del gen con el mismo nombre. El gen *BDNF* humano tiene una localización citogenética 11p14.1 (Cromosoma 11: 27654893-27722058, hebra reversa), consta de ocho exones 5' (exón I-VIII) cada uno con su respectivo promotor y un exón 3' (exón IX) que codifica la proteína BDNF (5, 37). En humanos se han identificado dos exones específicos llamados exones Vh y VIIIh (Figura 2). Los diferentes empalmes que puede tomar el gen permite la formación de transcripciones específicas para distintos tejidos que responden a una amplia variedad de estímulos (5, 38).



**Figura 2.** Estructura del gen *BDNF* humano. El gen contiene 11 exones (I – IX, más Vh y VIIIh), que se combinan en muchas transcripciones diferentes. La secuencia de DNA codificante (CDS) está en el exón IX. También se reportan sitios alternativos de donantes de empalme e islas CpG. *BDNF*, factor neurotrófico derivado de cerebro.

Modificado de: Cattaneo A, et al (37); por Miriam Inés Cruz Rodríguez (2019)

La neurotrofina más estudiada a lo largo del tiempo ha sido el BDNF debido a sus características multifuncionales y a su alta distribución en el cerebro de los mamíferos. Fue aislado por primera vez en 1982 por Yves-Alain Barde y Hans Thoenen a partir de cerebro de cerdo <sup>(39)</sup>, esto permitió el estudio de su estructura química <sup>(40)</sup> y la comprensión de su diversidad funcional <sup>(5, 35)</sup>.

BDNF es un polipéptido de 27 kDa, se encuentra principalmente en el SNC de los mamíferos en zonas como el hipocampo, la corteza cerebral, la amígdala y el cerebelo <sup>(5, 41)</sup>. Sin embargo, también se expresa ampliamente en otros tejidos, entre ellos el corazón, riñón, pulmón y testículos <sup>(5)</sup>. Esta neurotrofina es producida durante toda la vida, desde el desarrollo hasta la etapa adulta. Su función difiere según la etapa de vida del cerebro y los componentes neuronales, gliales o vasculares del tejido cerebral <sup>(4, 5)</sup>.

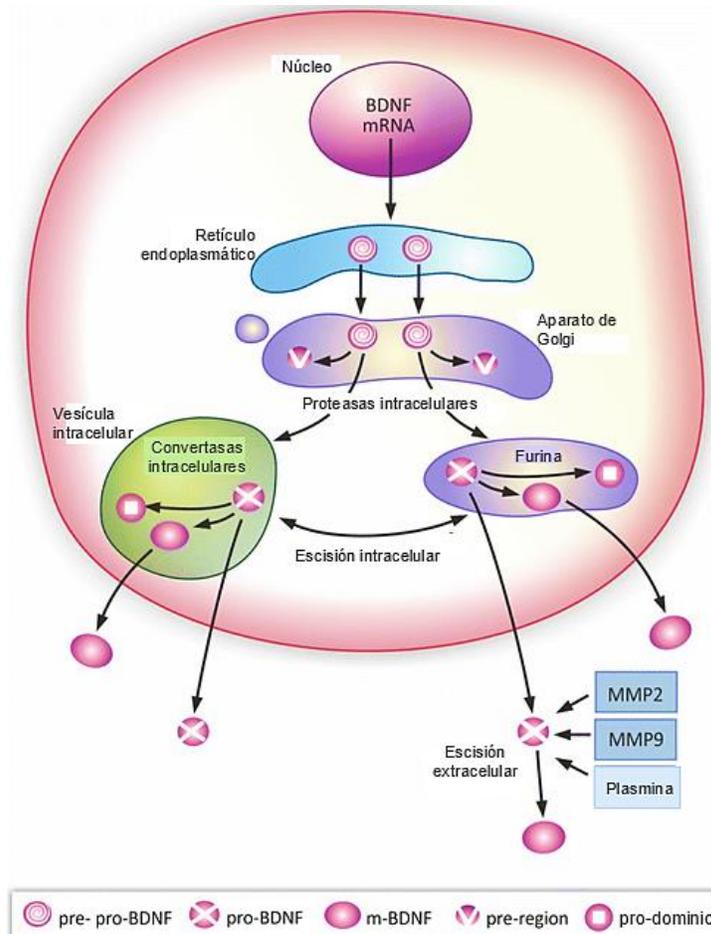
Las funciones más importantes de BDNF incluyen procesos de desarrollo, regulación de neurogénesis, gliogénesis, sinaptogénesis, neuroprotección, control de interacciones sinápticas de corta y larga duración que influyen en los mecanismos de la memoria y la cognición. También, puede prevenir la muerte celular programada (apoptosis) <sup>(4, 5, 37)</sup>. BDNF se ha identificado siendo mediador de respuestas adaptativas del cuerpo a cambios en la ingesta y el gasto de energía. Por ejemplo, la asociación entre el ejercicio y la alimentación en la secreción de BDNF <sup>(4)</sup>.

Los efectos funcionales de BDNF, al ser una proteína secretada, dependen del tiempo, la cantidad, la ubicación de la producción y de los receptores a los que se une <sup>(37)</sup>. Dependiendo del tipo de célula, la secreción de BDNF puede ser constitutiva o dependiente de la actividad. La multifuncionalidad de esta neurotrofina se puede explicar a partir de su síntesis, la cual involucra varias isoformas biológicamente activas que interactúan con diferentes receptores controlando así numerosas vías de señalización <sup>(5, 42)</sup>.

#### 4.3.1 Síntesis e isoformas activas de BDNF

La síntesis y maduración de BDNF es un proceso multietapa, que implica la formación de distintas isoformas precursoras <sup>(5, 34)</sup>. La proteína BDNF se sintetiza en el retículo endoplásmico en su forma precursora, pre-pro-BDNF (Figura 3). Tras la translocación al aparato de Golgi, la secuencia de la pre-región se escinde, provocando la formación de la isoforma precursora de proneurotrofina de BDNF (pro-BDNF). Este polipéptido consta de 129 aminoácidos que contienen un pro-dominio y 118 aminoácidos con un dominio-maduro. El pro-BDNF se corta para obtener la

isoforma madura (m-BDNF) <sup>(4, 5, 34)</sup>. La escisión intracelular de pro-BDNF puede ocurrir en la red trans-Golgi por furina de liberación constitutiva o en vesículas secretoras intracelulares por convertasas reguladas. La escisión extracelular de pro-BDNF depende de la plasmina y las metaloproteasas de matriz 2 y 9 (MMP2 y MMP9). La secreción de m-BDNF y pro-BDNF en el espacio extracelular es la que permite su acción fisiológica <sup>(5)</sup>.



**Figura 3.** Representación esquemática de la síntesis y maduración de BDNF.

Modificado de: Kowiański P, et al (5); por Miriam Inés Cruz Rodríguez (2019)

En las células neuronales, pro-BDNF y m-BDNF se liberan después de la despolarización de la membrana celular. La proporción de pro-BDNF a m-BDNF varía entre las etapas particulares del desarrollo cerebral y los demás órganos del cuerpo. Durante el período postnatal temprano se ha observado mayor concentración de pro-BDNF, mientras que m-BDNF prevalece en la edad adulta <sup>(43)</sup>. Con base en esto, pro-BDNF se considera un factor importante que modula la función cerebral, especialmente en el neurodesarrollo, mientras que m-BDNF tiene mayor importancia para los procesos que ocurren en la edad adulta, como la neuroprotección y la plasticidad sináptica <sup>(5, 43)</sup>.

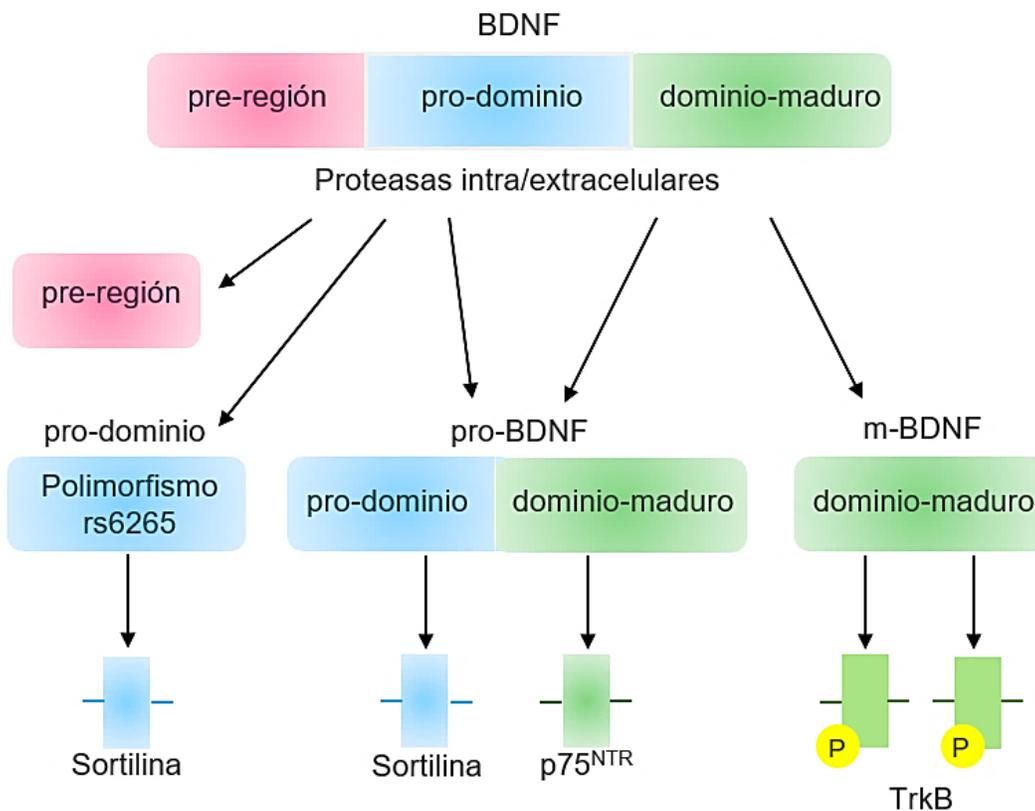
Además de las dos isoformas, pro-BDNF y m-BDNF, el funcionamiento del BDNF se ve significativamente afectado por una variante genética que puede estar presente en la región pro-dominio, la SNV rs6265 .

#### 4.3.2 Receptores de BDNF

El BDNF tiene afinidad por tres diferentes tipos de receptores, esto relacionado con sus diferentes isoformas y sus diversas funciones. Los sitios de unión relacionados con estas proteínas son el receptor de neurotrofina p75 (p75<sup>NTR</sup>), los receptores tirosina-cinasa (Trk) y la sortilina, la unión a cada uno de ellos es altamente específica. El receptor de neurotrofina p75<sup>NTR</sup> es una glicoproteína de 75 kDa, miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, relacionado principalmente con las vías de señalización del BDNF que llevan a apoptosis. En el caso de Trk, existen tres tipos: A, B y C, BDNF presenta afinidad por TrkB. Este una vez estimulado sufre una homodimerización y autofosforilación. El tercer receptor,

sortilina, es una proteína miembro de la familia de receptores de clasificación Vps10p <sup>(34)</sup>.

El pro-dominio de BDNF se une preferentemente al receptor de sortilina y el dominio-maduro al receptor TrkB (Figura 4). Debido a esto, pro-BDNF, compuesta por pro-dominio y dominio-maduro, interactúa con sortilina y p75<sup>NTR</sup>, respectivamente. Mientras que m-BDNF, constituida únicamente por el dominio-maduro, tiene afinidad por el receptor TrkB. La SNV Val66Met debido a su presencia en el pro-dominio de la proteína, mantiene una unión preferente con sortilina <sup>(5,20)</sup>.



**Figura 4.** Interacción de las isoformas de BDNF con receptores específicos.

Modificado de: Kowiański P, et al (5); por Miriam Inés Cruz Rodríguez (2019)

A través de la expresión diferencial y localización celular de sus receptores, las neurotrofinas pueden provocar diversas funciones celulares en diversos tipos de neuronas <sup>(5, 35)</sup>.

#### 4.4 Variantes genéticas

La variación genética es generada continuamente por procesos de cambio en el genoma, es persistente y determinada por factores genéticos y ambientales <sup>(44)</sup>. Estas alteraciones se pueden dividir en dos clases diferentes, según su composición de nucleótidos: variantes de un solo nucleótido y variantes estructurales <sup>(45)</sup>.

Las SNV son variaciones de la secuencia de DNA en las que se altera un solo nucleótido (nt), ya sea citosina (C), timina (T), adenina (A) o guanina (G). Por parte de las variantes estructurales, existen 4 principales tipos: las variantes de inserción-eliminación (indels), las sustituciones en bloque, las variantes de inversión y las variantes de número de copias. Los indels ocurren cuando uno o más pares de bases están presentes en algunos genomas, pero ausentes en otros, suelen componerse de unas pocas bases, pero pueden tener una longitud superior a 80 kb. Las sustituciones de bloque son casos en los que una cadena de nucleótidos contiguos varía entre dos genomas. Mientras que, una variante de inversión es aquella en la que el orden de los pares de bases se invierte en una sección definida de un cromosoma. Por último, las variantes de número de copias se producen cuando se repiten secuencias idénticas o casi idénticas en algunos cromosomas, pero no en otros <sup>(45)</sup>.

La clase más frecuente de variación genética es la SNV la cual consiste en el cambio de un nt con base de purina ya sea a otra base de purina o a una base

de pirimidina. Un polimorfismo genético se define como una variante de secuencia que tiene una frecuencia en la población de al menos el 1%, por lo que se considera común <sup>(44)</sup>. Se estima que hay al menos 52 327 221 de SNV en el genoma humano <sup>(45)</sup>.

El Sequence Variant Description Working Group (SVD-WG) sugiere sustituir el término polimorfismo y mutación por un término neutro para ambos, evitando así confusión en sus definiciones. SVD-WG propone utilizar únicamente los vocablos: variante y cambio para referirse a dichas variantes genéticas <sup>(46)</sup>. Sin embargo, por practicidad, en esta tesis se utilizarán indistintamente los términos variante genética y polimorfismo.

#### **4.5 Variante rs6265 del gen *BDNF***

Una SNV ampliamente estudiada es el polimorfismo rs6265 con localización citogenética 11p14.1 (Cromosoma 11: 27658369), la cual es debida a una variación en el gen *BDNF*. Esta alteración genética, es una SNV con efecto biológico lo que la vuelve un polimorfismo funcional y es no sinónima por la obtención de un aminoácido diferente, existe un intercambio de una Val por una Met (Val66Met). La variante es resultante de la sustitución de una G (alelo de referencia) por una A (alelo de riesgo) en la posición del codón 66 de este gen en la región codificante prodominio <sup>(5)</sup>.

La neuroprotección brindada por BDNF está relacionada con la modulación de la señalización dependiente de NMDAR/Ca<sup>2+</sup> (Complejo Ácido N-metil-D-aspartico/Ca<sup>2+</sup>). El primer postulado sobre este efecto se basa en que m-BDNF una vez unido a TrkB desencadena una vía de señalización impulsada por

NMDAR/Ca<sup>2+</sup>, lo cual inhibe la entrada de Ca<sup>2+</sup> eliminando la excitotoxicidad glutamatérgica y brindando el efecto protector. Por otro lado, también se plantea que la estimulación de NMDAR extrasináptico permite la entrada de Ca<sup>2+</sup> al núcleo, lo que provoca la activación de CREB (Elemento respuesta de unión a cAMP, por sus siglas en inglés). El factor de transcripción CREB da lugar a la transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en la neuroprotección, incluido el *BDNF* <sup>(5)</sup>.

La variante Val66Met afecta predominantemente al proceso de organización de vesículas secretoras sintetizadas de la neurotrofina, lo que resulta en una reducción de la secreción dependiente de actividad de m-BDNF <sup>(34)</sup>.

#### **4.6 Variante rs6265 y su impacto en los procesos cognitivos humanos**

La disminución de la secreción de BDNF provocada por la presencia de Val66Met afecta la plasticidad sináptica e influye así en el funcionamiento cognitivo <sup>(47)</sup>. Aunado a esto, el avance de la edad se ha relacionado con la reducción potencial de la secreción de BDNF, alterando en formas específicas el aprendizaje y la memoria en humanos <sup>(48)</sup>.

Los humanos portadores de un genotipo homocigoto a G han demostrado un mejor desempeño en tareas de memoria y de codificación alfabética en comparación a sujetos con el genotipo homocigoto y heterocigoto a A <sup>(49)</sup>. Igualmente, durante la aplicación de pruebas cognitivas, la presencia del alelo A ha mostrado una reducción en el desempeño cognitivo <sup>(47)</sup>. Sin embargo, la forma en que la memoria puede verse afectada por presencia del alelo de riesgo durante el

envejecimiento en relación con el polimorfismo rs6265, aún no ha sido completamente especificada <sup>(50)</sup>.

Aunado a esto, debido a la alta distribución de BDNF en el hipocampo la presencia de la SNV rs6265 se ha relacionado con la reducción de materia gris en este órgano, dando como resultado déficit en funciones importantes de memoria <sup>(45, 49, 51)</sup>.

Por otra parte, la relación que mantiene el BDNF con la plasticidad sináptica ha permitido realizar estudios donde se formula una relación entre el sueño y la memoria. Esta explicación se basa en la función del sueño de restablecer la capacidad diaria del individuo para aprender y adaptarse constantemente al entorno a través de la plasticidad cerebral. Personas portadoras del genotipo homocigoto a G han mostrado un mejor rendimiento de la memoria después de una noche de sueño consolidado. En comparación con individuos portadores del polimorfismo, en los cuales es ausente una asociación positiva con la calidad del sueño <sup>(48)</sup>.

Asimismo, el nivel de actividad física se ha asociado con la secreción de BDNF mejorando así la plasticidad cerebral y con esto la salud del cerebro. La presencia de la SNV rs6265 afecta esta interacción, anulando el aumento de la secreción de la neurotrofina por efecto de ejercicio físico <sup>(51)</sup>.

En contraste a todos los hallazgos mencionados, se ha encontrado que el alelo A también puede desempeñar un papel protector neurológico <sup>(52, 53)</sup>. También se propone el que pueda estar asociado con mejores habilidades de razonamiento no verbal en adultos mayores, lo que sugiere que ciertos efectos del polimorfismo serían específicos de la enfermedad, el dominio, la población, el género y la edad <sup>(47)</sup>.

Las discrepancias en los resultados de un estudio a otro, donde en algunos la relación del polimorfismo y la cognición es positiva, se pueden deber a una amplia serie de variables. Entre ellas, las diferencias en el diseño de estudio, las poblaciones utilizadas y las tareas cognitivas evaluadas <sup>(49)</sup>.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El deterioro cognitivo es un proceso natural relacionado con la edad, sin embargo, contribuye de manera importante en la calidad de vida durante la tercera edad por su relación con problemas de memoria, lenguaje y razonamiento. Estos cambios en la cognición se han asociado con diversas condiciones ambientales y genéticas. Algunas variantes genéticas se han identificado como posibles factores de riesgo para un mayor déficit cognitivo, entre ellos los polimorfismos.

En particular, el BDNF es una neurotrofina relacionada con el desarrollo y la plasticidad neuronal, por lo cual es de gran importancia en el aprendizaje y memoria. Un polimorfismo del gen que codifica a este factor, la SNV rs6265, se ha asociado con una menor secreción de la proteína, afectando con esto el desempeño cognitivo. Un estudio más amplio de este polimorfismo permitiría la identificación de nuevos biomarcadores genéticos específicos. Estos biomarcadores contribuirían en la implementación de un diagnóstico temprano y en el reconocimiento de posibles blancos terapéuticos en el manejo clínico de enfermedades relacionadas con el deterioro cognitivo en el adulto mayor <sup>(49)</sup>.

Es de suma importancia el estudio del deterioro cognitivo en adultos mayores para prevenir el desarrollo de demencia. Aunado a esto, el incremento de la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas al trastorno neurocognitivo mayor como lo son la EA y la EP.

## 6. HIPÓTESIS

La variante rs6265 afecta la secreción de la proteína BDNF, lo cual disminuye la plasticidad sináptica repercutiendo en el funcionamiento cognitivo. Lo que permite plantear una asociación entre el desempeño cognitivo y la SNV en adultos mayores de población mestizo-mexicana.

## **7. OBJETIVO**

Evaluar la asociación entre el polimorfismo rs6265 del BDNF y el desempeño cognitivo en adultos mayores mestizo-mexicanos mediante un estudio de asociación genética.

### **7.1 Objetivos específicos**

- Analizar mediante genotipificación a la SNV rs6265 en muestras sanguíneas.
- Determinar la frecuencia alélica del alelo silvestre y del alelo polimórfico de nuestra población con base en la frecuencia genotípica.

## 8. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1 Diseño: Casos y controles.

Alcance de estudio: Correlacional

Tipo de estudio:

- De acuerdo al periodo de captación de información: Prospectivo.
- De acuerdo a la evolución del fenómeno estudiado: Transversal
- De acuerdo con la comparación de las poblaciones: Comparativo
- De acuerdo con la interferencia del investigador en el fenómeno: Observacional.

### 8.2 Universo

Un total de 100 adultos mayores, de los cuales 50 fueron hombres y 50 mujeres, formaron parte en el estudio.

### 8.3 Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Edad mínima de 65 años
- Origen mestizo-mexicano según los criterios de Gamboa <sup>(54)</sup>

- Estar de acuerdo en firmar carta de consentimiento de participación en el estudio

**Criterios de exclusión:**

- Presencia de enfermedades crónicas no controladas
- Antecedentes personales de enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas
- Analfabetismo
- Puntuación menor de 24 en MMSE.

**Criterios de eliminación:**

- Muestra de DNA no disponible

**8.4 Variables**

Independientes:	Dependientes:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presencia del polimorfismo rs6265 en el gen <i>BDNF</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desempeño cognitivo</li> <li>• Puntuación de MMSE</li> </ul>

**8.5 Descripción del estudio**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Neurotoxicología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez (INNN-MVS) en colaboración con el Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores (INAPAM).

### 8.5.1 Firma de carta consentimiento y cuestionario de ingreso

Se proporcionó a cada voluntario una carta de consentimiento informado para registrar su ingreso al estudio, comunicando en qué consistiría y haciendo la toma de muestra sanguínea requerida para el protocolo de investigación. Una vez firmada dicha carta, de manera individual, se aplicó un cuestionario para recabar datos sociodemográficos, clínicos, antecedentes personales y heredofamiliares.

### 8.5.2 Escalas neuropsiquiátricas

Junto con el cuestionario de ingreso se aplicó la batería de pruebas neuropsiquiátricas, en nuestro estudio se utilizó MMSE (evaluación cognitiva) y GDS (evaluación de estado de ánimo). La aplicación y evaluación de estas pruebas fue realizada por personal capacitado: psicólogos y psiquiatras.

Evaluación cognitiva.

El nivel cognitivo fue valorado utilizando la prueba de MMSE (Anexo 1). Para el desarrollo del estudio, se estableció un punto de corte con puntuaciones mayores e iguales a 24 en la prueba, indicando así la ausencia de un probable deterioro cognitivo en los participantes.

Evaluación de depresión geriátrica.

La escala de GDS (Anexo 2) versión corta de 15 reactivos fue utilizada para evaluar el nivel de depresión de los participantes, debido a la asociación demostrada entre el polimorfismo rs6265 y dicha enfermedad <sup>(55)</sup>.

### 8.5.3 Metodología experimental (Técnicas)

#### 8.5.3.1 Obtención de muestras sanguíneas

Se tomaron dos tubos de 5 mL de sangre periférica en tubos Vacutainer™ con buffer de citratos.

#### 8.5.3.2 Extracción de DNA

El DNA se obtuvo de muestras de sangre periférica utilizando una técnica modificada de extracción por método salino <sup>(56)</sup>, como se menciona a continuación:

La muestra de sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos para separar el plasma, los leucocitos y los eritrocitos. Se tomó la capa de leucocitos y se le adicionó solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (BLGR) ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.155 M /  $\text{KHCO}_3$  10 mM / EDTA 0.5 M pH 8), se homogenizó para lograr la ruptura de los glóbulos rojos. Mediante centrifugaciones y solución BLGR se obtuvo un botón leucocitos limpios del que se extrajo el DNA.

Posteriormente, se agregó 1 mL de solución amortiguadora TTS (Tris 10 mM / Tritón 1% / Sacarosa 0.32 M) y se homogenizó para centrifugar a 10 000 rpm durante 1 minuto. Una vez hecho esto se decantó, al botón obtenido se agregaron 570  $\mu\text{L}$  de cloruro de sodio (NaCl) 5 mM y se agitó. Después, se adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% y se mezcló. Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de NaCl saturado (6 M) y se agitó para la precipitación de proteínas. Seguido a ello, se centrifugó a 11 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se recuperó en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de etanol (EtOH) absoluto, se agitó y por precipitación se obtuvo el DNA. A continuación, la muestra se centrifugó a 11 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se decantó y agregó

1 mL de EtOH al 70% para luego centrifugarlo a 11 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se decantó y el botón se disolvió con solución amortiguadora TE (Tris 10 mM / EDTA 0.5M pH 8) 100 – 300 µL, en función del tamaño del botón. Finalmente, las muestras de DNA se almacenaron a 4 °C.

#### 8.5.3.3 Cuantificación de DNA

Se determinó la concentración y pureza de las muestras, mediante análisis espectrofotométrico, utilizando un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTek, EUA). La longitud de onda se estableció de 260 nm para el DNA y 280 nm para las proteínas, identificando la relación entre 1.8 y 2<sup>(57)</sup>. La integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% / TBE 0.5X, a 100 voltios por 40 minutos.

A partir de las muestras de DNA se prepararon diluciones a una concentración de 50 µg/mL para su posterior uso en la técnica de genotipificación.

#### 8.5.3.4 Diseño de oligonucleótidos

En el análisis se utilizaron oligonucleótidos específicos para la SNV rs6265. El diseño de los iniciadores se realizó empleando los programas informáticos en línea: Ensembl genome browser, Primer3 web, Two-state melting (folding) y BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

El primer paso fue buscar el polimorfismo rs6265 de *BDNF* en humanos en Ensembl genome browser, obteniendo información detallada de la SNV disponible en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Una vez identificada la secuencia de DNA del gen, diferentes partes de esta se copiaron al

programa Primer3 web versión 4.1.0. Estos fragmentos de la secuencia se tomaron como diferentes opciones de iniciadores, considerando que tuvieran tamaños de entre 150 y 200 pb, y que incluyeran a la variante. Los diferentes iniciadores obtenidos se analizaron en Two-state melting (folding), perteneciente al servidor web DINAmelt de la Universidad de Albany, analizando puntos de fusión y condiciones de trabajo. La opción más óptima se examinó en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Herramienta básica de búsqueda de alineación local) del NCBI para asegurar la especificidad hacia la especie y el gen objetivo.

El par de oligonucleótidos diseñado fue: F (5'-GCT TGA CAT TGG CTG AC -3') y R (5'- TTT CTG GTC CTC ATC CAA CA-3').

#### 8.5.3.5 Secuenciación de Sanger

La estandarización del método de genotipificación se efectuó mediante Secuenciación de Sanger <sup>(58)</sup>, donde se obtuvieron las muestras control para cada genotipo. La técnica se realizó con un Kit de secuenciación de ciclo BigDye™ de la marca ThermoFisher SCIENTIFIC con número de catálogo 4337450. Dividiendo al proceso en cuatro pasos: preparación del templete (muestras), ciclo de secuenciación, purificación de la reacción y electroforesis capilar. Realizando esta última en un Analizador genético 3130 de la marca Applied Biosystems. El procedimiento fue implementado según las indicaciones del protocolo dado por el proveedor del Kit.

### 8.5.3.6 Genotipificación por HRM

El análisis de disociación en alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés) es una técnica que consiste en la comparación y el estudio de curvas de disociación de las cadenas de DNA. Estas curvas se obtienen una vez que el DNA de doble cadena (DNA bicatenario) es desnaturalizado (sometiéndolo a su temperatura de fusión), lo que permite que se puedan estudiar ambas cadenas por separado en busca de variaciones <sup>(59)</sup>.

El principio del análisis de HRM se basa en el comportamiento de fusión (disociación) del DNA a medida que cambia del estado de doble cadena a cadena única en presencia de un colorante fluorescente. El análisis de fusión detecta diferencias en los amplicones de la PCR (polymerase chain reaction; reacción en cadena polimerasa) que dependen de la longitud y la composición de la base <sup>(60)</sup>.

El HRM es un método utilizado para el escaneo de genes, el genotipificado de polimorfismos y la identificación de alteraciones epigenéticas en muestras de DNA <sup>(59, 61)</sup>.

La SNV Val66Met fue genotipificada a través de la técnica de HRM, utilizando un equipo Rotor-gene 6000 (Corbett Research, Australia) en condiciones térmicas específicas (Tabla 1). La reacción de HRM se preparó con una Master mix KAPA™ HRM FAST PCR Kit de la marca KAPABIOSYSTEMS, siguiendo las indicaciones del protocolo brindado por el proveedor.

---

**Tabla 1.** Condiciones térmicas de la corrida de HRM

---

Condición	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
Activación de Taq	95° C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	5 seg	45
Alineamiento	61°C	40 seg	45
Desnaturalización	95°C	1 min	1
pre-HRM			
HRM	70-83° C	2 seg por paso	1
	Incremento de 0.1°C		

---

Tiempo aproximado de corrida: 98 minutos. C= Celsius; min= minutos; seg= segundos.

## 8.6 Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SPSS v.18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA.). El Test de Shapiro–Wilk se utilizó para evaluar la normalidad en todas las variables.

Las variables cuantitativas se presentan en promedio y desviación estándar. La comparación entre grupos de las variables cuantitativas se realizó mediante la prueba de t de Student y U de Mann-Whitney, según su normalidad. Las variables categóricas se presentan en frecuencias absolutas y porcentajes, el contraste entre estas variables se analizó con pruebas de chi-cuadrada ( $\chi^2$ ). La significación estadística se estableció en  $p \leq 0.05$ .

El cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se realizó comparando la frecuencia genotípica esperada con la frecuencia genotípica obtenida, mediante una

$\chi^2$ . La frecuencia esperada se calculó tomando en cuenta el tamaño de la muestra y las frecuencias alélicas.

Las correlaciones se realizaron entre las puntuaciones de MMSE y las diferentes variables cuantitativas (edad, peso, talla, años de escolaridad, puntuación de GDS y los niveles de glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y triglicéridos). Se utilizó el coeficiente de correlación Rho de Spearman (r) como factor de asociación debido al tipo de variables, no paramétricas. Según el valor absoluto de r obtenido se midió el grado de covariación, donde una r menor a 0.30 indicaba una asociación débil, una r mayor a 0.30 pero menor a 0.70 una asociación moderada y una r mayor a 0.70 una asociación fuerte.

### **8.7 Aspectos éticos y legales**

Esta investigación se apega a las normas éticas, al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, a la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos, 1997 y a la Declaración de Helsinki, 64<sup>a</sup> Asamblea General, octubre 2013. Toda la información de los participantes se mantiene confidencial. Además, se firmó un consentimiento informado por cada uno de los sujetos para autorizar su participación en el estudio.

## 9. RESULTADOS

### Análisis poblacional

La población estuvo compuesta por 100 adultos mayores, 50 hombres y 50 mujeres.

La tabla número 2 resume las variables sociodemográficas y clínicas de la muestra estratificada por género.

**Tabla 2.** Características clínicas y sociodemográficas de la población.

	Total (±DE)	Hombres (±DE)	Mujeres (±DE)	ρ
Género	n= 100	n= 50	n= 50	-
Edad	73.05 (5.40)	74.02 (5.83)	72.08 (4.79)	0.099 <sup>b</sup>
Escolaridad	12.00 (3.95)	12.06 (4.41)	11.94 (3.48)	0.634 <sup>b</sup>
Hijos	3 (2)	3 (2)	3 (2)	0.136 <sup>b</sup>
GDS	1.53 (2.06)	1.7 (1.89)	1.36 (2.22)	0.160 <sup>b</sup>
MMSE	28.17 (1.62)	28.00 (1.75)	28.34 (1.47)	0.392 <sup>b</sup>
Glucosa	118.04 (50.92)	122.61 (60.65)	113.46 (38.97)	0.909 <sup>b</sup>
Urea	37.25 (13.45)	37.26 (12.25)	37.24 (14.68)	0.901 <sup>b</sup>
Creatinina	0.85 (0.25)	0.96 (0.19)	0.74 (0.25)	<b>0.000</b> <sup>b*</sup>
Ácido úrico	5.59 (1.19)	6.02 (1.19)	5.17 (1.03)	<b>0.000</b> <sup>a*</sup>
Colesterol	208.41 (43.65)	204.78 (47.68)	212.03 (39.36)	0.260 <sup>b</sup>
Triglicéridos	192.39 (155.45)	214.15 (206.79)	170.64 (71.38)	0.363 <sup>b</sup>
	Total (%)	Hombres (%)	Mujeres (%)	
<b>VARIABLES CLÍNICAS</b>				
Café	74 (74)	36 (72)	38 (76)	0.257 <sup>c</sup>
Alcohol	30 (30)	23 (46)	7 (14)	0.000 <sup>c*</sup>
Cigarro	12 (12)	7 (14)	5 (10)	0.510 <sup>c</sup>
Marihuana	1 (1)	1 (2)	0 (0)	0.368 <sup>c</sup>
Hipertensión	39 (39)	14 (28)	25 (50)	<b>0.024</b> <sup>c*</sup>
Diabetes	21 (21)	9 (18)	12 (24)	0.461 <sup>c</sup>
Osteoartritis	3 (3)	0 (0)	3 (6)	0.079 <sup>c</sup>
Osteoporosis	4 (4)	0 (0)	4 (8)	<b>0.041</b> <sup>c*</sup>
Hipotiroidismo	3 (3)	0 (0)	3 (6)	0.079 <sup>c</sup>
Gastritis	2 (2)	1 (2)	1 (2)	1.000 <sup>c</sup>
Cáncer	1 (1)	1 (2)	0 (0)	0.315 <sup>c</sup>

Los grupos de hombres y mujeres fueron comparados con t de Student (a) o U de Mann Whitney (b) para variables cuantitativas y con  $\chi^2$  (c) para variables categóricas. Las variables cuantitativas son presentadas por promedio (±DE) y las variables categóricas como n (%). GDS = Geriatric Depression Scale; MMSE= Mini Mental State Examination; DE= Desviación estándar. Edad y educación (años). Glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y triglicéridos (mg/dL). \*  $\rho < 0.05$

La edad promedio de la población general fue de  $73.05 \pm 5.40$  años con rango entre 65 y 89 años, sin diferencia significativa ( $p= 0.099$ ) entre hombres ( $74.02 \pm 5.83$  años) y mujeres ( $72.08 \pm 4.79$  años).

La escolaridad promedio ( $12.00 \pm 3.95$  años) confirma a participantes alfabetas. La media del puntaje de GDS ( $1.53 \pm 2.06$ ) y MMSE ( $28.17 \pm 1.62$ ) sugieren que los participantes no presentan alguna enfermedad depresiva o cognitiva, respectivamente. La escolaridad ( $p= 0.634$ ), la valoración del estado de ánimo (GDS ( $p= 0.160$ )) y la evaluación cognitiva (MMSE ( $p=0.392$ )) no presentaron valores estadísticamente significativos por género, y se encontraron acorde a los criterios de inclusión.

El análisis de química sanguínea de 6 elementos realizado a los participantes (Tabla 2) incluyó la evaluación de los niveles de glucosa, urea, colesterol, triglicéridos, creatinina y ácido úrico. Los resultados para el nivel de la glucosa ( $118.04 \pm 50.92$  mg/dL) en la población total estuvieron por arriba de los valores recomendados (80-110 mg/dL), sin diferencia significativa ( $p=0.909$ ) entre hombres ( $122.61 \pm 60.65$  mg/dL) y mujeres ( $113.46 \pm 38.97$  mg/dL). La evaluación de urea en hombres ( $37.26 \pm 12.25$  mg/dL) y mujeres ( $37.24 \pm 14.68$  mg/dL) mostró valores similares ( $p= 0.901$ ), manteniéndose dentro de los parámetros de referencia (15-45 mg/dL) para ambos grupos y en la población total ( $37.25 \pm 13.45$  mg/dL). El valor de la creatinina entre hombres ( $0.96 \pm 0.19$  mg/dL) y mujeres ( $0.74 \pm 0.25$  mg/dL) presentó diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0.000$ ). Sin embargo, este parámetro estuvo dentro del rango normal (0.7-1.4 mg/dL) en el total de los participantes ( $0.85 \pm 0.25$  mg/dL) y para ambos géneros. En el nivel del ácido úrico se observó diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.000$ ) por género (hombres

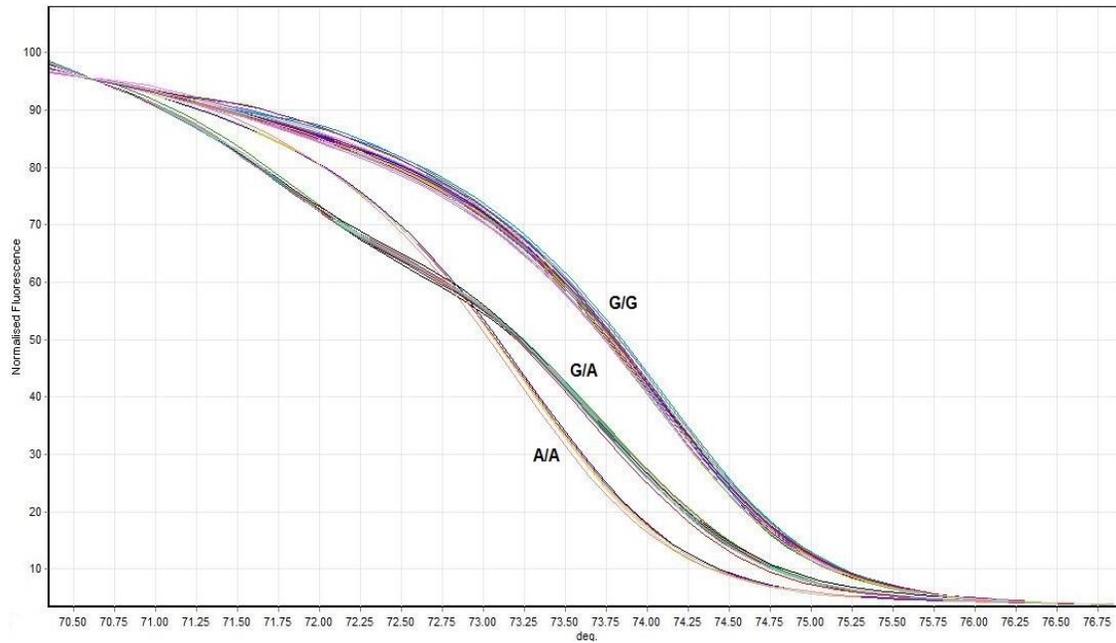
( $6.02 \pm 1.19$  mg/dL) y mujeres ( $5.17 \pm 1.03$  mg/dL)). El valor recomendado de ácido úrico para hombres es de 3.4 a 7.0 mg/dL y para mujeres de 2.5 a 6.0 mg/dL; de esta forma, los niveles se encontraron dentro del rango de referencia en el total de los participantes ( $5.59 \pm 1.19$  mg/dL) y en ambos géneros. La cuantificación del colesterol presentó niveles dentro de lo recomendado (menor a 220 mg/dL) tanto en la población general ( $208.41 \pm 43.65$  mg/dL), en mujeres ( $212.03 \pm 39.36$  mg/dL) y en hombres ( $204.78 \pm 47.68$  mg/dL). En caso contrario, el nivel de los triglicéridos en el total de los participantes ( $192.39 \pm 155.45$  mg/dL), en hombres ( $214.15 \pm 206.79$  mg/dL) y en mujeres ( $170.64 \pm 71.38$  mg/dL) fue mayor que el nivel de referencia (menor a 150 mg/dL). Al realizar un contraste entre géneros de los valores de colesterol y triglicéridos no se identificó diferencia significativa en ninguno de los parámetros ( $p$  igual a 0.260 y 0.363, respectivamente).

En cuanto a variables clínicas (categóricas), se incluyeron hábitos personales como el consumo de café, alcohol, tabaco y marihuana, además de enfermedades crónicas declaradas por los participantes (Tabla 2). El hábito de toma de café estuvo presente en el 74% del total de los participantes, en el 72% de los hombres y el 76% de las mujeres, sin diferencia significativa entre géneros ( $p=0.257$ ). En el consumo regular de alcohol (30% de la población general) se observó que el 46% de los hombres y el 14% de las mujeres referían esta actividad, con diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0.000$ ) entre ambos grupos. El uso declarado de tabaco por la población total (12%) y de marihuana (1%), no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.510$  y  $p= 0.368$ , respectivamente) entre el porcentaje de hombres que aceptó consumirlos (14% y 2%, respectivamente) y el de mujeres (10%, 0%). Las enfermedades crónicas consideradas fueron

hipertensión, diabetes, osteoartritis, osteoporosis, hipotiroidismo, gastritis y cáncer. La hipertensión estuvo presente en el 39% de la población total, en el 50% de las mujeres y en el 28% de los hombres, con diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.024$ ) entre los dos géneros. La diabetes se identificó en el 21% del total de participantes, en el 18% de los hombres y el 24% de las mujeres, sin diferencia estadística significativa por género ( $p= 0.461$ ). La osteoartritis fue declarada por el 3%, la osteoporosis por el 4% y el hipotiroidismo por el 3% en la muestra general de la población, enfermedades presentes únicamente en el grupo de mujeres. La osteoartritis y el hipotiroidismo no representaron diferencias estadísticamente significativas al compararse entre géneros ( $p= 0.079$ , en ambos casos). En cuanto a la osteoporosis, esta obtuvo valor estadísticamente significativo con  $p$  de 0.041 al cotejar el grupo de hombres contra el de mujeres. Por último, el cáncer se presentó en el 1% de la población total, el 2% de los hombres declaró haber padecido la enfermedad, porcentaje que no representó diferencia estadística significativa ( $p= 0.315$ ) al contraponer este grupo con el grupo femenino.

### Genotipificación

El análisis de HRM, realizado mediante curvas de disociación (Figura 4), permitió establecer las frecuencias genotípicas de la variante rs6265 en la población de estudio (Tabla 3).



**Figura 4.** Ejemplo de curvas de fusión en un análisis de HRM, diferenciando a los tres diferentes genotipos.

**Tabla 3.** Frecuencia genotípica y alélica de la SNV rs6265

	Total (%)	Hombres (%)	Mujeres (%)	Valor de $\rho$
G/G	73 (73)	36 (72)	37 (74)	0.823
G/A	27 (27)	14 (28)	13 (26)	
A/A	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
G	173 (86.5)	86 (86)	87 (87)	0.841
A	27 (13.5)	14 (14)	13 (13)	
H. W.	$\rho = 0.1186$	$\rho = 0.2497$	$\rho = 0.2907$	

Las frecuencias son presentadas como n (%). Las variables son comparadas entre los grupos con  $\chi^2$ . \*  $\rho < 0.05$

### *Proporción de alelos*

En el total de la población, el alelo de menor frecuencia (MAF, por sus siglas en inglés, Minor Allele Frequency) fue el A (13.5%) y el alelo de referencia el G (86.5%). En hombres, el MAF se presentó en 14% y el alelo G en 86%. Por otra parte, para el género femenino se identificó el alelo G en 87% y el A en 13%. Al comparar la proporción alélica por género no se observó diferencia significativa ( $p = 0.841$ ) (Tabla 3).

La frecuencia alélica fue comparada con el proyecto 1000 genomas en fase 3, tomando como referencia a población con ancestría mexicana de residencia en los Ángeles, California. La población de dicho proyecto tiene porcentaje del 80% para el alelo G y 20% para el A, al compararse con la población del presente estudio no denotó diferencia significativa ( $\chi^2 = 1.51$ ,  $p = 0.2191$ ).

### *Proporción de genotipos*

En el total de los participantes se presentó el genotipo G/G (homocigotos al alelo G) en un 73% y con 27% el genotipo G/A (heterocigotos). El genotipo A/A (homocigoto MAF) no se identificó en ninguno de los sujetos analizados. Al comparar las proporciones genotípicas entre hombres y mujeres no se presentó una diferencia significativa ( $p=0.823$ ) (Tabla 3). En los hombres, el genotipo G/G se identificó en un 72% del grupo y el genotipo G/A en el 28%. En el caso de las mujeres, el 74% fueron homocigotas a alelo G y un 26% heterocigotas. Las frecuencias observadas y esperadas para rs6265 estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg para la población total y en ambos géneros (población  $p = 0.1186$ , hombres  $p = 0.2497$  y mujeres  $p = 0.2907$ ).

Dos de los tres genotipos (G/G, G/A, A/A) para Val66Met fueron encontrados dentro de nuestra población. Basados en esto y con la intención de identificar si el alelo de riesgo A se asocia al desempeño cognitivo se realizó un modelo genético dominante. Este modelo se basó en agrupar a la población en dos conjuntos, el primero conformado por sujetos homocigotos a G (G/G) y el segundo por sujetos portadores del MAF (G/A y A/A).

## Análisis genotípico

Los datos sociodemográficos y clínicos fueron comparados entre los portadores del alelo A y los homocigotos a G (Tabla 4).

<b>Tabla 4.</b> Características clínicas y sociodemográficas de la población por agrupación genotípica				
	G/G (%) (n=73)	G/A + A/A (%) (n=27)	Estadística	Valor de p
<b>Género</b>				
Masculino	36 (49.32)	14 (51.85)	$\chi^2=0.51$	0.822
Femenino	37 (50.68)	13 (48.15)		
	G/G ( $\pm$ DE)	G/A + A/A ( $\pm$ DE)		
Edad	73.32 (5.6)	72.33 (4.84)	U = 886.000	0.439
Escolaridad	11.86 (3.93)	12.37 (4.07)	U = 881.500	0.409
GDS	1.41 (1.98)	1.85 (2.27)	U = 870.500	0.350
MMSE	28.10 (1.59)	28.37 (1.69)	U = 862.000	0.327
Glucosa	121.75 (57.71)	108.02 (22.56)	U = 982.000	0.978
Urea	36.5 (9.51)	39.29 (20.8)	U = 933.500	0.686
Creatinina	0.83 (0.19)	0.90 (0.35)	U = 947.000	0.765
Ácido úrico	5.59 (1.1)	5.61 (1.45)	t = -0.069	0.945
Colesterol	198.44 (37.2)	235.36 (48.8)	U = 543.500	<b>0.001*</b>
Triglicéridos	182.7 (160.14)	218.6 (141.49)	U = 684.500	0.019*
	G/G (%)	G/A + A/A (%)		
<b>Variables clínicas</b>				
Café	52 (71.2)	22 (81.5)	$\chi^2= 1.483$	0.477
Alcohol	17 (23.29)	13 (48.15)	$\chi^2= 6.437$	<b>0.040*</b>
Cigarro	6 (8.22)	6 (22.22)	$\chi^2= 3.952$	0.139
Marihuana	0 (0)	1 (3.7)	$\chi^2= 5.518$	0.063
Hipertensión	32 (43.84)	7 (25.93)	$\chi^2= 2.657$	0.103
Diabetes	14 (19.18)	7 (25.93)	$\chi^2= 0.541$	0.462
Osteoartritis	1 (1.37)	2 (7.41)	$\chi^2=2.469$	0.116
Osteoporosis	2 (2.74)	2 (7.41)	$\chi^2= 1.118$	0.290
Hipotiroidismo	2 (2.74)	1 (3.7)	$\chi^2= 0.63$	0.802
Gastritis	2 (2.74)	0 (0)	$\chi^2= 0.755$	0.385
Cáncer	1 (1.37)	0 (0)	$\chi^2= 0.374$	0.541

Los grupos de homocigotos a G y portadores del alelo A fueron comparados con t de Student o U de Mann Whitney para variables cuantitativas y con  $\chi^2$  para variables categóricas. Las variables cuantitativas son presentadas por promedio (DE) y las variables categóricas como n (%). GDS = Geriatric Depression Scale; MMSE= Mini Mental State Examination; DE= Desviación estándar. Edad y educación (años). Glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y triglicéridos (mg/dL). \*  $p < 0.05$

El promedio de edad para el grupo G/G fue de  $73.32 \pm 5.6$  años y para los portadores de A de  $72.33 \pm 4.84$  años. Los años de escolaridad en los individuos homocigotos a G se identificaron en  $11.86 \pm 3.93$  y de  $12.37 \pm 4.07$  para individuos portadores del MAF. En ambas medidas, la edad ( $p= 0.439$ ) y escolaridad ( $p= 0.409$ ), no se mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de genotipos.

En la evaluación del estado de ánimo, el puntaje de GDS ( $1.85 \pm 2.27$ ) para los portadores del alelo A no mostró diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0.350$ ) al compararse con el puntaje de los homocigotos al alelo G ( $1.41 \pm 1.98$ ).

La evaluación de MMSE para los sujetos G/G presentó puntuación promedio de  $28.10 \pm 1.59$  Y de  $28.37 \pm 1.69$  para los portadores de A, sin obtener diferencia significativa ( $p= 0.327$ ) entre ellos.

En cuanto a las variables de la química sanguínea, en los niveles de glucosa, urea, creatinina y ácido úrico no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos genotípicos (Tabla 4). Sin embargo, el colesterol y los triglicéridos mostraron valores estadísticamente significativos ( $p$  de 0.001 y de 0.019, respectivamente) entre los dos genotipos. En los portadores del alelo A, los niveles de colesterol ( $235.36 \pm 48.8$ ) se encontraron fuera del valor recomendado (menor a 220 mg/dL), contrario a los homocigotos G ( $198.44 \pm 37.2$  mg/dL). Para los triglicéridos, ambos grupos genotípicos excedieron el nivel óptimo de este analito, menor a 150 mg/dL. Los sujetos G/G mostraron valor de  $182.7 \pm 160.14$  mg/dL y los portadores del MAF promedio de  $218.6 \pm 141.49$  mg/dL.

Los resultados fueron ajustados por variables que se ha reportado afectan la cognición, por ejemplo: género, edad, años de escolaridad, nivel de glucosa, triglicéridos y colesterol, utilizando la razón de momios.

En el caso de las variables categóricas (Tabla 4), los hábitos de consumo de café, tabaco y marihuana, entre ambos grupos, no señalaron diferencias estadísticamente significativas. En particular, la ingesta usual de alcohol se presentó 23.29% en el grupo homocigoto a G y con 48.15% para los portadores de A, al comparar ambos conjuntos se identificó diferencia estadística significativa ( $p=0.040$ ). Por otra parte, la comparación entre los grupos portadores de A y los G/G no mostró diferencias estadísticas significativas para las enfermedades de hipertensión, diabetes, osteoartritis, osteoporosis, hipotiroidismo, gastritis y cáncer.

## Análisis cognitivo

El puntaje total del MMSE y sus diferentes subpruebas se examinaron por grupo genotípico en el total de la población y por género (Tabla 5).

<b>Tabla 5. MMSE total y subpruebas</b>									
Prueba y subpruebas	Total			Hombres			Mujeres		
	G/G (±DE)	G/A + A/A (±DE)	ρ	G/G (±DE)	G/A + A/A (±DE)	ρ	G/G (±DE)	G/A + A/A (±DE)	ρ
MMSE	28.10 (1.591)	28.37 (1.690)	0.327	27.97 (1.647)	28.07 (2.056)	0.620	28.22 (1.548)	28.69 (1.182)	0.394
Orientación/ tiempo	4.90 (0.296)	4.96 (0.192)	0.338	4.92 (0.280)	5.00 (0.000)	0.270	4.89 (0.315)	4.92 (0.277)	0.750
Orientación/ lugar	4.96 (0.200)	4.96 (0.192)	0.927	4.94 (0.232)	4.93 (0.267)	0.834	4.97 (0.164)	5.00 (0.000)	0.553
Memoria	3.00 (0.000)	3.00 (0.000)	1.000	3.00 (0.000)	3.00 (0.000)	1.000	3.00 (0.000)	3.00 (0.000)	1.000
Memoria de trabajo	4.48 (0.884)	4.41 (1.010)	0.760	4.56 (0.843)	4.57 (0.852)	0.893	4.41 (0.927)	4.23 (1.166)	0.592
Memoria diferida	2.12 (0.971)	2.30 (0.823)	0.512	1.92 (1.025)	2.00 (0.961)	0.838	2.32 (0.884)	2.62 (0.506)	0.390
Lenguaje	2.96 (0.200)	3.00 (0.000)	0.287	2.94 (0.232)	3.00 (0.000)	0.373	2.97 (0.164)	3.00 (0.000)	0.553
Comprensión	2.88 (0.371)	2.81 (0.396)	0.338	2.92 (0.368)	2.71 (0.469)	<b>0.032*</b>	2.84 (0.374)	2.92 (0.277)	0.451
Comprensión de lectura	1.00 (0.000)	1.00 (0.000)	1.000	1.00 (0.000)	1.00 (0.000)	1.000	1.00 (0.000)	1.00 (0.000)	1.000
Escritura	0.95 (0.229)	0.96 (0.192)	0.719	0.94 (0.232)	0.93 (0.267)	0.834	0.95 (0.229)	1.00 (0.000)	0.397
Praxias	0.85 (0.360)	0.96 (0.192)	0.122	0.83 (0.378)	0.93 (0.267)	0.388	0.86 (0.347)	1.00 (0.000)	0.167

Las variables son presentadas por promedio (DE). Se compara a los grupos genotípicos con U de Mann Whitney. MMSE= Mini Mental State Examination; DE= Desviación estándar. \*  $\rho < 0.05$

Los 10 subtest de la prueba de MMSE considerados fueron: Orientación y tiempo, orientación y lugar, memoria, memoria de trabajo (atención y cálculo), memoria diferida, lenguaje, comprensión, comprensión de lectura, escritura y praxias.

En el total de la población no se identificó diferencia significativa entre los portadores del alelo A y el grupo G/G en el puntaje total ni en las subpruebas de MMSE. En el grupo de mujeres, de igual forma, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos genotípicos estudiados para ninguna de las puntuaciones evaluadas. Por otro lado, en los hombres se encontró un resultado estadísticamente significativo en el subtest de comprensión. Los hombres homocigotos al alelo G ( $2.92 \pm 0.368$ ) mostraron mejor desempeño cognitivo en comparación a los hombres portadores del alelo A ( $2.71 \pm 0.469$ ) con diferencia estadística significativa de 0.032.

### Correlaciones con MMSE

Las correlaciones se utilizaron para medir el grado de asociación de MMSE con las variables clínicas y sociodemográficas (Tabla 2) incluidas en el estudio.

Los resultados se mostraron estadísticamente significativos en la asociación de MMSE con los años de escolaridad. Primero, se realizó un análisis para la población total (Figura 5 (a)) donde se obtuvo una  $r$  de 0.350, indicando asociación moderada ( $p= 0.000$ ).

- Correlación por grupo genotípico.

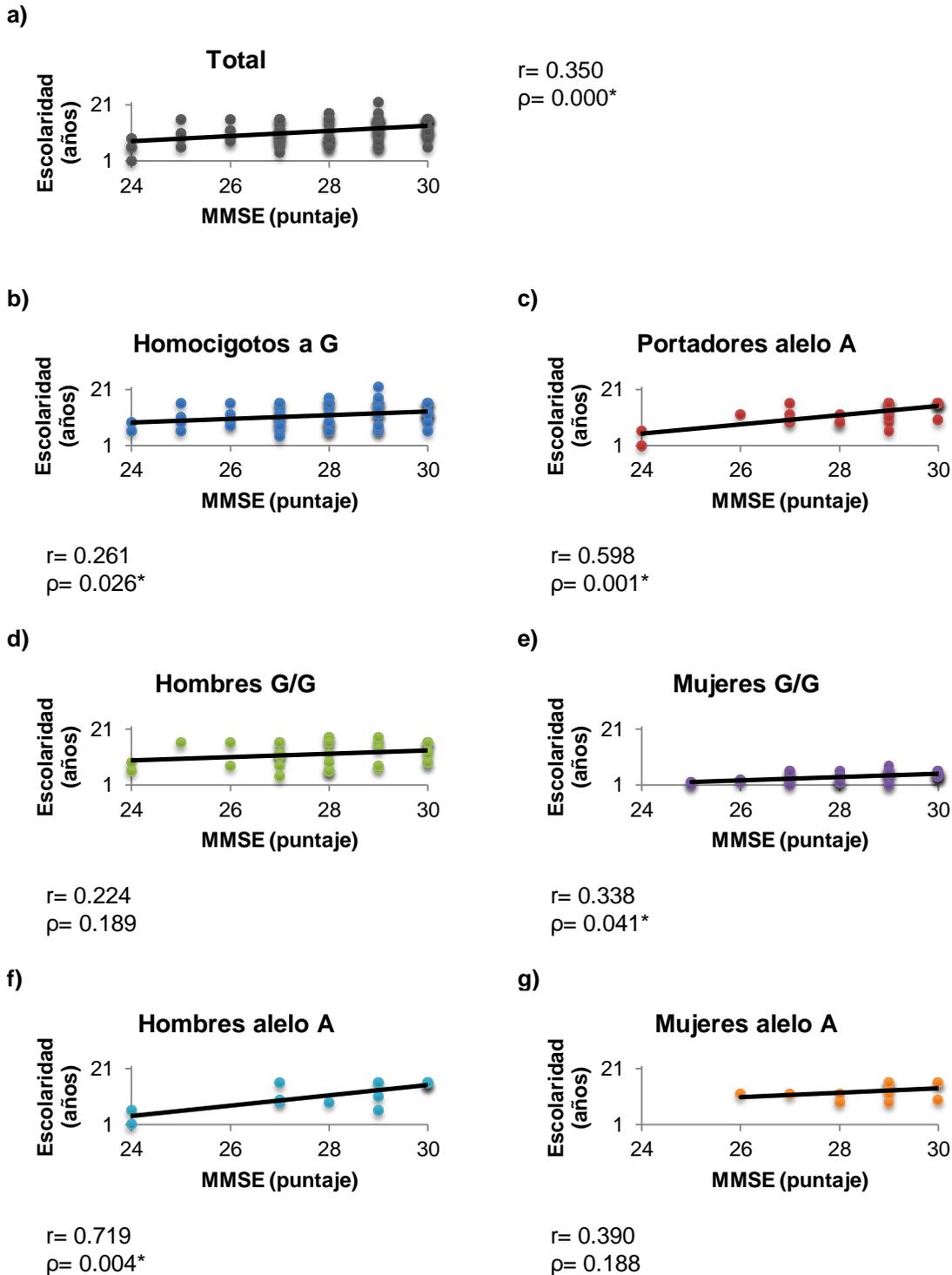
La siguiente correlación se realizó por grupo genotípico, los sujetos portadores del alelo A (Figura 5 (c)) ( $r= 0.598$ ,  $p= 0.001$ ) mostraron asociación moderada entre el

puntaje de MMSE y los años de educación. Mientras que los sujetos homocigotos al alelo G (Figura 5 (b)) ( $r= 0.261$ ,  $p= 0.026$ ) tuvieron asociación débil.

- Correlación género-grupo genotípico.

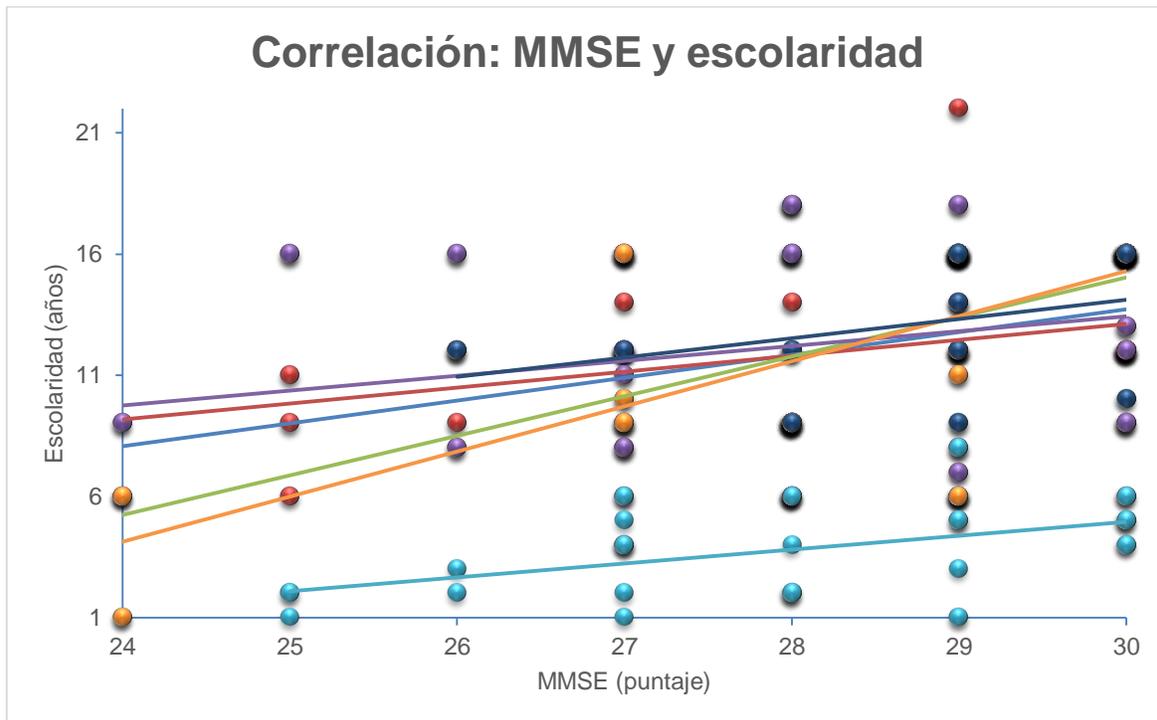
Por último, ambos géneros se analizaron por grupo genotípico: hombres homocigotos a G (Figura 5 (d)), mujeres homocigotas a G (Figura 5 (e)), hombres portadores del alelo A (Figura 5 (f)) y mujeres portadoras del alelo A (Figura 5 (g)).

En el caso de los hombres, los homocigotos al alelo G mostraron asociación débil ( $r= 0.224$ ,  $p= 0.189$ ). Sin embargo, la mayor asociación entre las variables del puntaje de MMSE y los años de escolaridad se obtuvo en los portadores masculinos del alelo A con correlación fuerte ( $r= 0.719$ ,  $p= 0.004$ ). Por su parte, ambos grupos genotípicos de mujeres obtuvieron asociaciones moderadas. Las homocigotas al alelo G con  $r$  igual a  $0.338$  ( $p= 0.041$ ) y las portadoras del MAF con  $r$  de  $0.390$  ( $p= 0.188$ )



**Figura 5.** Gráficas de correlación. Puntajes obtenidos en MMSE vs años de escolaridad. (a) Población total, (b) Sujetos homocigotos al alelo G, (c) Sujetos portadores del alelo A, (d) Sujetos hombres homocigotos al alelo G, (e) Sujetos mujeres homocigotas al alelo G, (f) Sujetos hombres portadores del alelo A, (g) Sujetos mujeres portadoras del alelo A.  $|r| < 0.3$  asociación débil;  $0.30 \leq |r| \leq 0.70$  asociación moderada;  $|r| > 0.70$  asociación fuerte.  
 $^* \rho < 0.05$

Para una mejor apreciación de las correlaciones, se contrastaron en una misma gráfica (Figura 7) a todos los grupos establecidos, confirmando mayor asociación entre las variables para los hombres portadores del alelo A.



**Figura 7.** Gráfica de correlación de los diferentes grupos. Puntajes obtenidos en MMSE vs años de escolaridad. (●) Población total, (●) Sujetos homocigotos a al alelo G, (●) Sujetos portadores del alelo A, (●) Sujetos hombres homocigotos a al alelo G, (●) Sujetos mujeres homocigotas a al alelo G, (●) Sujetos hombres portadores del alelo A, (●) Sujetos mujeres portadoras del alelo A.

## 10. DISCUSIÓN

Al BDNF se le ha relacionado principalmente con la plasticidad neuronal y sináptica, siendo importante en los procesos cognitivos <sup>(2, 50)</sup>. En este estudio evaluamos la posible asociación del polimorfismo rs6265 del gen *BDNF* con el rendimiento cognitivo en adultos mayores en una población mestizo-mexicana. El estudio analizó 100 sujetos sanos (50 hombres y 50 mujeres) con origen étnico similar y edad de 65 años en adelante. Nuestros resultados son consistentes con otros análisis publicados previamente que han asociado el estudio del polimorfismo con algunos dominios cognitivos <sup>(2, 50, 62)</sup>.

La población analizada no mostró la presencia de sujetos homocigotos al alelo de riesgo (A) en la proporción genotípica, siendo acorde con otras investigaciones <sup>(2, 52)</sup> y con el proyecto 1000 genomas <sup>(63)</sup>. Aún así, el MAF en nuestra muestra fue el A. Debido a la frecuencia genotípica obtenida, la comparación alélica fue desarrollada mediante el planteamiento de un modelo genético. Este modelo se utilizó para lograr una correcta comparación entre los portadores del alelo A (G/A y A/A) y los homocigotos G <sup>(50, 51)</sup>. Con base en que los genotipos G/A y A/A se han asociado con una disminución del rendimiento cognitivo en contraste con el genotipo G/G, además de ser un modelo comúnmente utilizado en la investigación de este SNV <sup>(2, 51, 64)</sup>.

Este estudio señala asociación del desempeño cognitivo y el genotipo al analizar los resultados estratificando por género. Así, los hombres portadores del MAF obtuvieron menor rendimiento cognitivo para la subprueba de comprensión en comparación con los homocigotos G. En tal sentido, recientemente Azeredo et al. <sup>(2)</sup> señaló la predisposición genética a menor rendimiento cognitivo en los adultos

mayores condicionado por la presencia del alelo A, especialmente por la disminución de los recursos cerebrales químicos y estructurales dados por la edad <sup>(2)</sup>. Para un homocigoto a G alcanzar el umbral de la proteína que contrarresta los efectos cognitivos del envejecimiento es más fácil que para los portadores del alelo A <sup>(51)</sup>.

El efecto del BDNF se ha asociado principalmente con la memoria, pero es probable que no sea selectivo a esta por su multifuncionalidad y amplia distribución en el cerebro <sup>(50)</sup>. Diversos estudios han encontrado que el polimorfismo Val66Met también ejerce efectos sobre otros dominios de la cognición además de la memoria: razonamiento <sup>(65)</sup>, funciones ejecutivas <sup>(66)</sup>, cambio de tareas <sup>(67)</sup>, atención <sup>(52)</sup> y velocidad de procesamiento <sup>(68)</sup>. Harris et al. <sup>(65)</sup> realizó un estudio donde observó que portadores del alelo A muestran una asociación con habilidades de razonamiento, teniendo un mejor desempeño que homocigotos a G <sup>(65)</sup>. Por otra parte, un estudio transversal donde se evaluaron funciones ejecutivas mostró que los adultos mayores de alrededor de 65 años pueden encontrar una mejora cognitiva asociada con el genotipo G/G. Mientras que si la muestra que se examina tiene una edad promedio de 75 años se puede producir el resultado opuesto <sup>(66)</sup>. Aunado a esto, Gajewski <sup>(67)</sup> encontró que puede existir un rendimiento superior de cambio de tareas basado en memoria en portadores del alelo A de edad avanzada debido a procesos de selección de respuesta más eficientes. Proponiendo que el alelo A hace que los procesos cognitivos sean más eficientes que el genotipo G/G en ancianos sanos <sup>(67)</sup>. Getzmann et al. <sup>(52)</sup> usando un paradigma de distracción auditiva, determinó que el genotipo G/G confiere una desventaja a sus portadores, por lo que un sujeto portador de A tiende a poseer una mejor atención durante el

envejecimiento <sup>(52)</sup>. Por último, una investigación donde se evaluó la disminución de la velocidad de percepción en los adultos mayores, las personas portadoras de A obtuvieron una disminución más pronunciada que los genotipos G/G <sup>(68)</sup>.

Igualmente, los resultados significativos para comprensión presentes en el género masculino, coinciden con lo encontrado por Verhagen et al. <sup>(55)</sup>, quien señaló una asociación entre Val66Met y el desorden de depresión mayor, presente únicamente en hombres <sup>(55)</sup>. La relación entre BDNF y el género masculino se ha estudiado desde el punto de vista hormonal. Los andrógenos, hormonas masculinas, son cruciales para el desarrollo de comportamientos específicos de los hombres y para el funcionamiento fisiológico. Existen estudios en animales que han demostrado que BDNF y los andrógenos pueden trabajar de manera cooperativa para influir en la plasticidad neuronal y modular la función del hipocampo lo que repercutiría en la cognición <sup>(69, 70)</sup>. Igualmente, se han identificado regiones del genoma vinculadas a enfermedades específicas por género en otras variantes genéticas <sup>(12)</sup>.

La correlación positiva observada entre MMSE y los años de escolaridad en nuestra población al analizarse por genotipo y sexo son un ejemplo de una relación gen-ambiente. El grupo masculino portadores del alelo A mostró la correlación más grande entre las dos variables (MMSE y educación), lo cual es consistente con un estudio realizado por Wei et al. <sup>(53)</sup>. En ese estudio se plantea que los hombres portadores de A reciben un mayor flujo sanguíneo a nivel cerebral lo que predispone a una mejor cognición, esto podría relacionarse a un mejor aprovechamiento del nivel escolar. Aunado a esto, Getzmann et al. <sup>(52)</sup> menciona la presencia de una

cualidad protectora brindada por el alelo A, donde los portadores de este tendrán un mejor desempeño en funciones ejecutivas.

Sin embargo, existen estudios <sup>(51, 64)</sup> que atañen al alelo A efectos negativos con respecto a la cognición. Los hábitos de vida, como la actividad física o el nivel de salud mental y la educación, se sabe que influyen en el rendimiento cognitivo de los adultos mayores. Son variables que al ser controladas se han reconocido en beneficio de la salud cerebral. Por ejemplo, se ha demostrado el papel del ejercicio físico como mediador en el aumento de las concentraciones de BDNF en el cerebro, beneficiando únicamente a sujetos homocigotos a G <sup>(51)</sup>. Además, se sabe que individuos portadores del alelo A pueden recibir un menor impacto en la función neurológica dada por la exposición a actividades ambientales que contribuyen al mantenimiento e incremento de la reserva cognitiva, debido a una plasticidad sináptica reducida <sup>(64)</sup>.

En nuestro estudio, sugerimos que la SNV rs6265 podría desempeñar un papel en la susceptibilidad del deterioro cognitivo en hombres de origen mexicano. Sin embargo, es importante realizar más estudios en sujetos mestizo-mexicanos, ya que el extrapolar datos de otras poblaciones no es posible. Se ha informado que algunos polimorfismos en individuos mexicanos tienen una alta frecuencia y son muy diferentes en otras ascendencias, esto podría hacer que nuestra población tenga una susceptibilidad diferente en ciertas enfermedades <sup>(71)</sup>. Investigaciones futuras de Val66Met con su asociación en neurocognición son importantes para ampliar su relevancia clínica.

Nuestros resultados deben interpretarse dentro del contexto de sus limitaciones y fortalezas. Los diseños transversales, no pueden evaluar el cambio

dentro de la persona a lo largo del tiempo; solo pueden estimar cómo puede evolucionar el proceso de envejecimiento <sup>(50)</sup>. Además, es necesario aumentar el tamaño de muestra para corroborar estos resultados y así contar con un mayor poder estadístico, puesto que nuestro proyecto solo es un estudio piloto. No obstante, cabe destacar que nuestro estudio fue realizado en una población alfabeta declarada clínicamente sana, es uno de los primeros realizados en población mestizo-mexicana para este polimorfismo y nos permite plantear nuevos proyectos en la búsqueda de un biomarcador genético.

## 11. CONCLUSIONES

El presente estudio sugiere que la SNV rs6265 influye en el dominio cognitivo de comprensión en adultos mayores masculinos. Además, en hombres portadores del alelo A se mostró una correlación positiva fuerte entre la cognición y los años de escolaridad.

Los resultados sugieren que esta variante podría desempeñar un papel importante en la cognición (particularmente en la comprensión) de población adulta mayor mexicana. Aunado a esto, ayudar a identificar personas con susceptibilidad al deterioro cognitivo para contribuir a mejorar su calidad de vida.

## 12. PERSPECTIVAS

Nuestra investigación contribuye a conocer mejor las características moleculares de BDNF lo que brinda una nueva perspectiva de las posibles implicaciones de esta neurotrofina en la cognición a nivel individual. Esta línea de investigación podría ser completada con el uso de diferentes pruebas neuropsiquiátricas específicas a diferentes dominios cognitivos. Además de poder aumentar el tamaño de muestra para verificar los resultados de nuestro estudio piloto.

Otros aspectos que pueden ser explorados de BDNF, utilizando las características moleculares encontradas son:

- Estudio de haplotipos utilizando otros SNVs del gen *BDNF* u otras variantes que hayan sido asociadas con deterioro cognitivo.
- Cuantificación del gen y de la proteína BDNF.
- Investigaciones epigenéticas en el gen *BDNF* para observar una mejor relación gen-ambiente.

Todos estos puntos con posibilidad a analizarse en sujetos sanos o poblaciones con alguna enfermedad neurológica.

### 13. REFERENCIAS

1. Kljajevic V. From cell to cognition: can changes in telomere length indicate patterns of cognitive aging?. *Clinical Science*. 2017; 121(7):313-314.
2. Azeredo L, De Nardi T, Levandowski M, Tractenberg S, Kommers-Molina J, Wieck A et al. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism affects memory performance in older adults. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2017; 39(2):90-94.
3. Deary I, Wright A, Harris S, Whalley L, Starr J. Searching for genetic influences on normal cognitive ageing. *Trends in Cognitive Sciences*. 2004; 8(4):178-184.
4. Marosi K, Mattson M. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2014; 25(2):89-98.
5. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2017; 38(3):579-593.
6. Paulsen J, Nance M, Kim J, Carlozzi N, Panegyres P, Erwin C et al. A review of quality of life after predictive testing for and earlier identification of neurodegenerative diseases. *Progress in Neurobiology*. 2013; 110:2-28.
7. Hingorani A, Shah T, Kumari M, Sofat R, Smeeth L. Translating genomics into improved healthcare. *BMJ*. 2010; 341.
8. Rajan K, Wilson R, Weuve J, Barnes L, Evans D. Cognitive impairment 18 years before clinical diagnosis of Alzheimer disease dementia. *Neurology*. 2015; 85(10):898-904.

9. Aarsland D, Creese B, Politis M, Chaudhuri K, Ffytche D, Weintraub D et al. Cognitive decline in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*. 2017; 13(4):217-231.
10. Dorsey E, Constantinescu R, Thompson J, Biglan K, Holloway R, Kieburtz K et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. 2006; 68(5):384-386.
11. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud. EUA: OMS; 2015.
12. Naciones Unidas, Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población. World population prospects: The 2017 revision, key findings and advance tables. No. ESA/P/WP/248. New York; 2017.
13. Bloom D. 7 billion and counting. *Science*. 2011;333(6042):562-569.
14. Johnson J, Finn K. Designing user interfaces for an aging population. EUA: Morgan Kaufmann; 2017.
15. Schmiedek F. Development of cognition and intelligence. *Personality Development Across the Lifespan*. 2017; 309-323.
16. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. 5a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2018.
17. Deary I, Corley J, Gow A, Harris S, Houlihan L, Marioni R et al. Age-associated cognitive decline. *British Medical Bulletin*. 2009;92(1):135-152.
18. Eshkoor S, Mun C, Ng C, Hamid T. Mild cognitive impairment and its management in older people. *Clinical Interventions in Aging*. 2015; 10:687-693.

19. De Jager P, Shulman J, Chibnik L, Keenan B, Raj T, Wilson R et al. A genome-wide scan for common variants affecting the rate of age-related cognitive decline. *Neurobiology of Aging*. 2012; 33(5): 1017.e1-1017.e15.
20. Morimoto S, Kanellopoulos D, Manning K, Alexopoulos G. Diagnosis and treatment of depression and cognitive impairment in late life. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015; 1345 (1): 36-46.
21. Harris S, Deary I. The genetics of cognitive ability and cognitive ageing in healthy older people. *Trends in Cognitive Sciences*. 2011.
22. Casey D. Depression in older adults. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2017;44(3):499-510.
23. Dotson V, Beydoun M, Zonderman A. Recurrent depressive symptoms and the incidence of dementia and mild cognitive impairment. *Neurology*. 2010;75(1):27-34.
24. Saczynski J, Beiser A, Seshadri S, Auerbach S, Wolf P, Au R. Depressive symptoms and risk of dementia: The Framingham Heart Study. *Neurology*. 2010;75(1):35-41.
25. Beal E. Depression and dementia. *Nature Reviews Neurology*. 2010;6(9):470-471
26. Albiński R, Kleszczewska-Albińska A, Bedyńska S. Geriatric Depression Scale (GDS). Validity and reliability of different versions of the scale. *Psychiatria polska*. 2011; 45(4):555-62.
27. Ariza M, Carballal Balsa M, Vales E, De las Heras Liñero E, Ferrer Gómez del Valle E. Guía de práctica clínica sobre el manejo de la depresión mayor en el adulto. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2008.

28. Yesavage J, Brink T, Rose T, Lum O, Huang V, Adey M et al. Development and validation of a geriatric depression screening scale: A preliminary report. *Journal of Psychiatric Research*. 1982;17(1):37-49.
29. Rodríguez-Testal J, Valdés M, Benítez M. Propiedades psicométricas de la escala geriátrica de depresión (GDS): análisis procedente de cuatro investigaciones. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. 2003;38(3):132-144.
30. Villarejo A, Puertas-Martín V. Utilidad de los test breves en el cribado de demencia. *Neurología*. 2011;26(7):425-433.
31. Folstein M, Folstein S, McHugh P. Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 1975; 12: 189-198.
32. Llamas Velasco S, Llorente Ayuso L, Contador I, Bermejo Pareja F. Versiones en español del Minimental State Examination (MMSE). Cuestiones para su uso en la práctica clínica. *Revista de Neurología*. 2015; 61(08):363.
33. Foltran R, Diaz S. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin?. *Journal of Neurochemistry*. 2016;138(2):204-221.
34. Adachi N, Numakawa T, Richards M, Nakajima S, Kunugi H. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases. *World Journal of Biological Chemistry*. 2014; 5(4):409-428.
35. Park H, Poo M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013; 14(1):7-23.

36. Binder D, Scharfman. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*. 2004;22(3):123-131.
37. Cattaneo A, Cattane N, Begni V, Pariante C, Riva M. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Translational Psychiatry*. 2016;6(11): e958-e958.
38. Wei Y, Wang S, Xu X. Sex differences in brain-derived neurotrophic factor signaling: Functions and implications. *Journal of Neuroscience Research*. 2016;95(1-2):336-344.
39. Barde Y, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO Journal*. 1982;1(5):549-553.
40. Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P et al. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. 1989;341(6238):149-152.
41. Hashimoto K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: An historical overview and future directions. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2010;64(4):341-357.
42. Song M, Martinowich K, Lee F. BDNF at the synapse: why location matters. *Molecular Psychiatry*. 2017;22(10):1370-1375.
43. Yang J, Harte-Hargrove L, Siao C, Marinic T, Clarke R, Ma Q et al. proBDNF negatively regulates neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus. *Cell Reports*. 2014;7(3):796-806.
44. Wright A. Genetic Variation: Polymorphisms and mutations. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2005

45. Rothe J, Nagy M. Strategies for excluding false Y-chromosomal SNP entries from human genome databases. *Electrophoresis*. 2012;33(9-10):1488-1491.
46. Den Dunnen J, Dalgleish R, Maglott D, Hart R, Greenblatt M, McGowan-Jordan J et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Human Mutation*. 2016; 37(6):564-569.
47. Miyajima F, Ollier W, Mayes A, Jackson A, Thacker N, Rabbitt P et al. Brain-derived neurotrophic factor polymorphism Val66Met influences cognitive abilities in the elderly. *Genes, Brain and Behavior*. 2008; 7(4):411-417.
48. Gosselin N, De Beaumont L, Gagnon K, Baril A, Mongrain V, Blais H et al. BDNF Val66Met polymorphism interacts with sleep consolidation to predict ability to create new declarative memories. *Journal of Neuroscience*. 2016; 36(32):8390-8398.
49. Dincheva I, Glatt C, Lee F. Impact of the BDNF Val66Met polymorphism on cognition. *The Neuroscientist*. 2012; 18(5):439-451.
50. Kennedy K, Reese E, Horn M, Sizemore A, Unni A, Meerbrey M et al. BDNF val66met polymorphism affects aging of multiple types of memory. *Brain Research*. 2015; 1612:104-117.
51. Canivet A, Albinet C, André N, Pylouster J, Rodríguez-Ballesteros M, Kitzis A et al. Effects of BDNF polymorphism and physical activity on episodic memory in the elderly: a cross sectional study. *European Review of Aging and Physical Activity*. 2015; 12(1).
52. Getzmann S, Gajewski P, Hengstler J, Falkenstein M, Beste C. BDNF Val66Met polymorphism and goal-directed behavior in healthy elderly — evidence from auditory distraction. *NeuroImage*. 2013; 64: 290-298.

53. Wei S, Eisenberg D, Kohn P, Kippenhan J, Kolachana B, Weinberger D et al. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism affects resting regional cerebral blood flow and functional connectivity differentially in women versus men. *Journal of Neuroscience*. 2012; 32(20):7074-7081.
54. Gamboa R, Hernandez-Pacheco G, Hesiquio R, Zuñiga J, Massó F, Montaña L et al. Apolipoprotein E polymorphism in the indian and mestizo populations of Mexico. *Human Biology*. 2000;72(6):975-981.
55. Verhagen M, Van der Meij A, Van Deurzen P, Janzing J, Arias-Vásquez A, Buitelaar J et al. Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity. *Molecular Psychiatry*. 2008; 15 (3):260-271.
56. Suguna S, Kamble S, Bharatha A, Kunkulol R. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non-enzymatic salting out method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014; 6:198-199.
57. Craig N, Green R, Cohen-Fix O, Greider C, Storz G. *Molecular biology: Principles of genome function*. 2a ed. Oxford: Oxford University Press; 2014.
58. Ravi I, Saxena J, Baunthiyal M. *Advances in biotechnology*. New Delhi: Springer; 2014.
59. Słomka M, Sobalska-Kwapis M, Wachulec M, Bartosz G, Strapagiel D. High Resolution Melting (HRM) for high-throughput genotyping—limitations and caveats in practical case studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(12):1-21.

60. Kalthoff D, Beer M, Hoffmann B. High resolution melting analysis: rapid and precise characterization of recombinant influenza A genomes. *Virology Journal*. 2013; 10(1):284-289.
61. Druml B, Cichna-Markl M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*. 2014; 158:245-254.
62. Toh Y, Ng T, Tan M, Tan A, Chan A. Impact of brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism on cognition: A systematic review. *Brain and Behavior*. 2018; 8 (7):1-14.
63. Gibbs R, Boerwinkle E, Doddapaneni H, Han Y, Korchina V, Kovar C et al. A global reference for human genetic variation. The 1000 Genomes Project Consortium. *Nature*. 2015; 526 (7571): 68-74.
64. Ward D, Summers M, Saunders N, Ritchie K, Summers J, Vickers J. The BDNF Val66Met polymorphism moderates the relationship between cognitive reserve and executive function. *Translational Psychiatry*. 2015; 5 (6): e590-e590.
65. Harris S, Fox H, Wright A, Hayward C, Starr J, Whalley L et al. The brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism is associated with age-related change in reasoning skills. *Molecular Psychiatry*. 2006; 11(5):505-513.
66. Erickson K. Genetic contributions to age-related decline in executive function: a 10-year longitudinal study of COMT and BDNF polymorphisms. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2008; 2.
67. Gajewski P, Hengstler J, Golka K, Falkenstein M, Beste C. The Met-allele of the BDNF Val66Met polymorphism enhances task switching in elderly. *Neurobiology of Aging*. 2011; 32 (12): 2327.e7-2327.e19.

68. Ghisletta P, Bäckman L, Bertram L, Brandmaier A, Gerstorf D, Liu T et al. The Val/Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene predicts decline in perceptual speed in older adults. *Psychology and Aging*. 2014; 29 (2):384-392.
69. Atwi S, McMahon D, Scharfman H, MacLusky N. Androgen modulation of hippocampal structure and function. *The Neuroscientist*. 2014;22(1):46-60.
70. Ottem E, Bailey D, Jordan C, Marc Breedlove S. With a little help from my friends: Androgens tap BDNF signaling pathways to alter neural circuits. *Neuroscience*. 2013; 239:124-138.
71. Bustamante C, De La Vega F, Burchard E. Genomics for the world. *Nature*. 2011; 475 (7355):163-165.

## 14. ANEXOS

### Anexo 1. Escala MMSE



**MINI EXAMEN DEL ESTADO MENTAL**  
"MINIMENTAL"

Nombre: ..... Fecha de Evaluación: ..... / ..... / .....

Escolaridad (en años): ..... No. Reg.: .....

**ORIENTACION**

1. Tiempo (máx. 5)	CALIF.	2. Lugar (máx. 5)	CALIF.
¿En que año estamos?:.....	0 1	¿Como se llama este hospital?:.....	0 1
¿En que mes estamos?:.....	0 1	¿En que piso estamos?:.....	0 1
¿Qué día del mes es hoy?:.....	0 1	¿Ciudad: Pueblo?:.....	0 1
¿Qué día de la semana es hoy?:.....	0 1	¿En que colonia estamos?:.....	0 1
¿Que hora es aproximadamente?:.....	0 1	¿En que país estamos?:.....	0 1

**MEMORIA**

3. Recordar el nombre de 3 objetos (máx. 3)	CALIF.
A. Papel	0 1
bicicleta	0 1
cuchara	0 1

**ATENCIÓN Y CALCULO**

4. Contar hacia atrás (máx. 5)	CALIF.
A.- (Restar) Contar hacia atrás de 7 en 7 a partir de 100	0 1
93	0 1
86	0 1
79	0 1
72	0 1
65	0 1

**MEMORIA DIFERIDA**

5. Recordar el nombre de 3 objetos (máx. 3)	CALIF.
A. Papel	0 1
bicicleta	0 1
cuchara	0 1

**LENGUAJE**

6. DENOMINAR (máx. 2)	CALIF.
¿Como se llama esto (señalar)?	0 1
A.- Reloj	0 1
Lapiz	0 1

**7. REPETICIÓN DE UNA FRASE (máx. 1)**

A. Ni no, ni si, ni pero	0 1
--------------------------	-----

**8. COMPRENSIÓN (máx. 3)**

Tome esta hoja con la mano derecha	0 1
dóblelo por la mitad	0 1
y pongalo en el suelo	0 1

**9. COMPRENSIÓN ESCRITA (máx. 1)**

Cierro los ojos	0 1
-----------------	-----

**10. ESCRITURA DE UNA FRASE (máx. 1)**

Escriba una frase completa (algo que ud. Quiera decir)	0 1
Si No	

**PRAXIAS**

11. COPIA DE UN DIBUJO (máx. 1)	CALIF.
	0 1

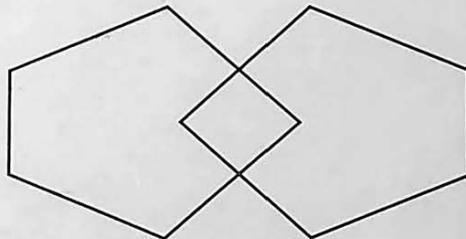
**Total:**

\* Aplicar en caso de baja escolaridad

# CIERRE SUS OJOS

Doble aquí

---



## Anexo 2. Escala GDS

Nombre del paciente \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Edad \_\_\_\_\_

	SI	NO
1. ¿En general, está satisfecho/a con su vida?	0	1
2. ¿Ha abandonado muchas de sus tareas habituales y aficiones?	1	0
3. ¿Siente que su vida esta vacía?	1	0
4. ¿Se siente con frecuencia aburrido/a?	1	0
5. ¿Se encuentra de buen humor la mayor parte del tiempo?	0	1
6. ¿Teme que algo malo pueda ocurrirle?	1	0
7. ¿Se siente feliz la mayor parte del tiempo?	0	1
8. ¿Con frecuencia se siente desamparado o desprotegido?	1	0
9. ¿Prefiere quedarse en casa, más que salir y hacer cosas nuevas?	1	0
10. ¿Cree que tiene más problemas de memoria que la mayoría de la gente?	1	0
11. ¿En estos momentos, piensa que es estupendo estar vivo/a?	0	1
12. ¿Actualmente se siente inútil?	1	0
13. ¿Se siente lleno/a de energía?	0	1
14. ¿Se siente sin esperanza en este momento?	1	0
15. ¿Piensa que la mayoría de la gente esta en mejor situación que usted?	1	0

**ESCALA DE DEPRESIÓN GERIÁTRICA, VERSIÓN ABREVIADA  
 (GDS, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS "GERIATRIC DEPRESSION SCALE")**