



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Estudio de diez polimorfismos -
SNPs- en pacientes con
enfermedad de Alzheimer (EA) en
una muestra colombiana.
Aproximación a genotipos
haploides.**

Jenny Consuelo Ortega Rojas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Maestría en Neurociencias
Bogotá D.C
2012

Estudio de diez polimorfismos - SNPs- en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) en una muestra colombiana. Aproximación a genotipos haploides.

Jenny Consuelo Ortega Rojas

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Neurociencias

Director:

MD, MSc. HUMBERTO ARBOLEDA GRANADOS

Grupo de Neurociencias - Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Neurociencias

Bogotá D.C

2012

A mi abuelita Carmen; mi ángel de la guarda.

A los pacientes con Enfermedad de Alzheimer y sus familiares.

"En la vida, el cambio es la única constante. Lo que nunca cambiará para mí es la esencia de tu ser". Martha Benavides (Hija de Paciente con Alzheimer)

Agradecimientos

A mi madre, Consuelo y a mi padre, Ambrosio. Que han sido mi ejemplo, mi apoyo incondicional e inspiración en mi vida personal y profesional. Gracias a ellos por mostrarme siempre el lado positivo de las cosas, por formarme y amarme.

A mis hermanas; Carolina y Laura por acompañarme siempre y brindarme siempre una mano firme e impulsarme a levantarme en los momentos difíciles.

A mi mejor amigo Víctor Luna por darme palabras de aliento, frases inolvidables y ser como un hermano para mí.

A Luis Carlos por ser la persona que me ha brindado su apoyo no solo en la investigación sino en mi vida. Gracias por escucharme, quererme, llorar y reír conmigo.

Al Profesor Humberto Arboleda por darme la oportunidad de trabajar a su lado y encaminarme a la investigación, por su paciencia, tiempo y sus palabras. Lo admiro inmensamente.

A mis profesores Juan Yunis, Gonzalo Arboleda y Liliana Francis Turner por ser ejemplo para mí.

A Paul Bloor por sus asesorías a lo largo de este trabajo.

A la Universidad del Tolima y la Universidad Nacional de Colombia por permitirme formarme en diferentes aspectos de mi vida y darme la oportunidad de conocer personas maravillosas.

A mis compañeros y amigos del Grupo de Neurociencias; María José C, Adrian S, Jenny J, Lina P, Helena H, Andrea N, Eduardo A, Magda L, Adriana M, Catalina P. Que han sido cómplices y testigos de mis tristezas y alegrías.

A mis amigos y amigas de la UT y de la vida. Por haber crecido, aprendido y caminado conmigo demostrarme siempre todo su respeto y cariño.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo más común de demencia, descrita en 1907 por Alois Alzheimer; desde entonces ha sido objeto de extensa investigación básica y clínica debido a su alto impacto económico y social principalmente en países en desarrollo como Colombia.

Basados en las diferencias poblacionales, los estudios de asociación buscan factores genéticos de susceptibilidad de enfermedades multifactoriales como la EA, en este tipo de estudios no es posible extrapolar los resultados de asociación ya que en cada población no solo se presentan diferencias genéticas sino que los individuos ven sometidos a diferentes factores ambientales que pueden contribuir al desarrollo de la patología. En este sentido, el Grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, se ha encaminado en la búsqueda de factores genéticos relacionados con la EA en la población Colombiana. Se ha adelantado estudios de asociación en genes como BDNF, COMT, TAU, UCHL1, entre otros, sin tener resultados positivos de asociación aparte de la replicación de asociación de APOEε4 con la EA. Continúa la exploración de factores genéticos de susceptibilidad para la EA en la población Colombiana, basados en múltiples hipótesis explicativas de como el metabolismo de lípidos, estrés oxidativo, transporte y degradación que pueden dar explicación a las características propias de la EA.

En los estudios caso-control realizados anteriormente en el Grupo se utilizaron técnicas como RFLPs las cuales tienen limitación en cuanto a tiempo de número de variantes evaluadas y especificad. Por la necesidad de avanzar en técnicas más costo-efectivas, en este trabajo se estandariza la técnica SNaPshot (Applied Biosystems) para 10 SNPs: CLU (rs11136000), PICALM (rs3851179), CR1 (rs665640), BIN1 (rs744373), TOMM40 (rs2075650), PVRL2 (rs6859), APOE (rs440446), SORL1 (rs11218304), CR1 (rs381861) y GWA_14q32.13 (rs11622883); permitiendo resultados más generalizables y robustos, acompañado de una disminución en costos y tiempo en comparación con otras técnicas de genotipificación.

Los SNPs evaluados en este trabajo han sido relevantes en los últimos años debido a que se reportan asociados con el desarrollo de la EA en los GWAS y replicados en estudios caso-control en diferentes poblaciones. Debido a que en Colombia no se tienen reportes de estos SNPs potencialmente importantes para la EA, este proyecto tiene como propósito realizar un estudio caso-control con el fin identificar el

riesgo de estas variantes génicas y establecer sus posibles interacciones en pacientes con EA en Colombia.

Además de los SNPs, entendiendo la EA como una enfermedad multifactorial fueron evaluados otros factores no genéticos como la escolaridad, estado civil, género por análisis de correspondencia múltiple (ACM) y multifactor-dimensionality reduction (MDR), estos métodos permiten la identificación y correlación de factores genéticos y ambientales que pueden actuar como predictores de riesgo a la EA.

En este estudio se encontró asociación significativa con APOEε4 en LOAD (OR: 14.74; CI: 0.838, 259.16) y EAOD (11.86; CI: 0.623, 225.63). En LOAD se encontró asociación con el polimorfismo TOMM40 (rs2075650) (OR: 3.869, CI: 2.12, 5.84; P: 4.656e-007) y GWArS11622883 (OR: 2.285, CI: 1.49, 3.48; P: 0.0001059). Así mismo se muestra una tendencia de asociación sin ser estadísticamente significativa en los SNPs BIN1rs744373 (OR: 1.519, CI: 0.94, 2.49; P: 0.08274), CLURs2279590 (OR: 1.346, CI: 0.90, 1.99; P: 0.1392) y CR1rs3818361 (OR: 1.385, CI: 0.81, 2.36; P: 0.232). Las diferencias encontradas aquí con los reportes en otras poblaciones quizás se deban a diferencias en el origen ancestral de los individuos evaluados, el tipo de análisis, los criterios de inclusión y exclusión de los individuos, la metodología usada en cada estudio, entre otras variables que pueden afectar de manera diferencial los resultados de los estudios de asociación genética.

La combinación de genotipos con los SNPs asociados (TOMM40, APOEε4 y GWA_14q32.13) permitió establecer que la combinación GCA que contiene los tres alelos de riesgo para confiere un riesgo incrementado (OR: 6.00, CI: 2.45, 14.70; p: 1.1274E-5), sin embargo, el hecho de tener solamente los alelos de riesgo para TOMM40 y APOE ε4 (GCT) confiere un riesgo aun mayor (OR: 9.97, CI: 2.28, 43.51; p: 1.0E-4), esto parece indicar que estos dos SNPs actúan de manera conjunta para producir EA en la muestra analizada..

Igualmente, se determinó que el género y el estado civil se encontraban asociados positivamente con el diagnóstico EA. Se encontró que el género se encontraba asociado con un p-valor (0.00593) y el estado civil con un p-valor de (8.353e-05) siendo este el más significativo de las variables analizadas. Los análisis de ACM y MDR muestran relación entre estado civil, escolaridad, TOMM40 y APOE, de manera que la combinación de estos factores podrían ser predictores de diagnóstico EA.

Los resultados aquí mostrados sugieren una asociación significativa con APOE, TOM40 y LOAD en población colombiana. Además, TOMM40 podría estar interactuando con APOE y factores de riesgo ambientales para modular el desarrollo de la EA en nuestra población. Al identificar estas variantes asociadas a EA en Colombia, sería necesario realizar futuras investigaciones para clarificar el

mecanismo de acción o ruta metabólica mediante la cual estas variaciones están implicadas al riesgo de desarrollar este tipo de demencia.

Palabra clave: Enfermedad de Alzheimer, Estudios de asociación, SNPs, TOMM40, APOE.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common dementia, described by Alois Alzheimer in 1907 and is important in extensive basic and clinical research because of its high economic and social impact mainly in developing countries such as Colombia.

Based on population differences, association studies search genetic susceptibility to multifactorial diseases such as AD, in this studies is not possible to extrapolate the association results and each population differ not only genetic but individuals are subjected to different environmental factors that may contribute to the development of pathology. In this regard, the Group of Neurosciences, Universidad Nacional de Colombia, has been directed in the search for genetic factors associated with AD in the Colombian population. Association studies are addressed in genes such as BDNF, COMT, TAU, UCHL1, among others, without positive results of association in addition of replication ApoEε4 with AD. Continues the exploration of genetic susceptibility factors for AD in the Colombian population, based on multiple hypotheses to explain like lipid metabolism, oxidative stress, transport and degradation that can provide an explanation for the characteristics of AD.

In case-control studies previously conducted in our Group as RFLP techniques were used which have a time limitation on number of variants assessed and specificity. By the need to advance cost-effective techniques, this work standardized SNaPshot technique (Applied Biosystems) for 10 SNPs: CLU(rs11136000), PICALM(rs3851179), CR1(rs665640), BIN1(rs744373), TOMM40(rs2075650), PVRL2(rs6859), APOE(rs440446), SORL1(rs11218304), CR1(rs381861) and GWA_14q32.13(rs11622883), allowing more generalizable and robust results, accompanied by a decrease in costs and time compared with other genotyping techniques.

The SNPs evaluated in this work have been important in recent years because they are reported associated with the development of AD in the GWAS and replicated in case-control studies in different populations. Because in Colombia there are no reports of these SNPs potentially important for AD, the aim here was conducted a case-control study to identify the risk of these genetic variants and to establish their possible interactions in patients with AD in Colombia .

In addition to SNPs, understanding the EA as a multifactorial disease were evaluated non-genetic factors such as education, marital status, gender by multiple correspondence analysis (MCA) and multifactor dimensionality-reduction (MDR), these methods allow the identification and correlation genetic and environmental factors that can act as predictors of risk for AD.

This study found significant association with LOAD ApoEe4 (OR 14.74, CI: 0.838, 259.16) and EAOD (11.86, CI: 0.623, 225.63). In association with LOAD was found TOMM40 polymorphism (rs2075650) (OR: 3,869, CI: 2.12, 5.84, P: 4.656e-007) and GWArS11622883 (OR: 2,285, CI: 1.49, 3.48, P: 0.0001059). It also shows a trend of association was not statistically significant in BIN1rs744373 SNPs (OR: 1,519, CI: 0.94, 2.49, P 0.08274), CLURs2279590 (OR: 1.346, CI: 0.90, 1.99, P: 0.1392) and CR1rs3818361 (OR: 1,385, CI: 0.81, 2.36, P: 0.232). The differences found here with reports in other populations may be due to differences in the ancestry of individuals tested, the type of analysis, the criteria for inclusion and exclusion of individuals, the methodology used in each study, among other variables differentially affect the results of genetic association studies.

The combination of genotypes associated SNPs (TOMM40, ApoEe4 and GWA_14q32.13) established that the combination GCA containing all three risk alleles conferred an increased risk (OR 6.00, CI: 2.45, 14.70, P = 1.1274E -5), however, having only the risk alleles for TOMM40 and APOE e4 (GCT) confers an even greater risk (OR 9.97, CI: 2.28, 43.51, P = 1.0E-4), this seems indicate that these two SNPs act together to produce EA in our sample.

Also found that gender and marital status were positively associated with the diagnosis AD. It was found that gender was associated with a p-value (0.00593) and marital status with a p-value (8.353e-05) being the most significant of the variables analyzed. The MCA and MDR analysis shows relationship between marital status, education, and APOE TOMM40, so that the combination of these factors could be predictors of AD diagnosis.

The results presented here suggest a significant association with APOE, TOM40 and LOAD in Colombian population. In addition, TOMM40 may be interacting with APOE and environmental risk factors to modulate the development of AD in our population. Identified these variants associated with AD in Colombia, future research would be needed to clarify the mechanism of action or metabolic pathway by which these variations are involved the risk of developing this type of dementia.

Keywords: Alzheimer's disease, association studies, SNPs, TOMM40, APOE.

Contenido

Resumen	5
Abstract	8
Introducción	15
Capítulo I. Marco Teórico.....	17
1.1 Enfermedad de Alzheimer	18
1.2 Enfermedad de Alzheimer en Colombia	21
1.3 Genes candidatos de susceptibilidad en la EA	22
1.3.1 Apolipoproteína E (APOE)	25
1.3.2 Clusterin (CLU)	26
1.3.3 Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein (PICALM)	28
1.3.4 Receptor de complemento tipo 1 (CR1)	30
1.3.5 Sortilin-related receptor (SORL1).....	31
1.3.6 Translocase of outer mitochondrial membrane 40 (TOMM40)	33
1.3.7 Poliovirus receptor-related 2 (PVRL2).....	35
1.3.8 Bridging integrator 1 (BIN1)	37
Capítulo II. Objetivos	39
2.1 Objetivo general	40
2.2 Objetivos específicos	40
Capítulo III. Materiales y métodos.....	41
3.1 Pacientes y Controles	42
3.2 Determinación de variaciones de interés (SNPs)	42
3.3 Aislamiento de ADN genómico	43

3.4 Diseño de Primers.....	44
3.5 PCR multiplex	44
3.6 Técnica de identificación de SNPs (SNaPshot)	45
3.7 Identificación de genotipos APOE	46
3.8 Estadísticos.....	47
3.8.1 Frecuencias alélicas y Genotípicas	47
3.8.2 Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE).....	47
3.8.3 Test de asociación.....	48
3.8.4 Test de desequilibrio de ligamiento.....	48
3.8.5 Análisis de correspondencia múltiple (ACM) y multifactor dimensionality reduction (MDR)	49
Capítulo IV. Resultados	50
4.1 Población de estudio.....	51
4.2 Genotipificación con la metodología SNaPshot	52
4.3 Distribución de los alelos de los 10 SNPs en pacientes con LOAD y EAOD..	56
4.4 Asociación de los SNPs con la enfermedad de Alzheimer (LOAD y EOAD) ..	62
4.5 Análisis de desequilibrio de ligamiento entre los marcadores.....	66
4.6 Asociación de de variables genéticas y ambientales con Diagnostico de Alzheimer.....	70
Capitulo V. Discusión y conclusiones.....	73
5.1 Discusión	75
5.2 Conclusiones.....	82
6. Perspectivas	82
ANEXOS	85
Anexo I. Primers usados para la amplificación por PCR de los SNPs.	85

Anexo II. Primers para la detección de los SNPs por la metodología SNaPshot.	86
Anexo III. Condiciones de amplificación por PCR de los 10 SNPs.	87
Anexo IV. Condiciones de amplificación por PCR de las PCR1, PCR2 y PCR3...88	
Anexo V. Condiciones de PCR y restricción para la identificación de APOEe2, e3 y e4.	88
Anexo VI. Condiciones para la detección de SNPs por SNaPshot y controles de la reacción.	89
Anexo VII. Foto de las amplificaciones de las PCR1 (P1), PCR2 (P2) y PCR3 (P3) y restricción para identificar APOE e2, e3 y e4 vistos a través de luz U.V.....	90
Anexo VIII. Esquema de la tecnología SNaPshot (Applied Biosystems) para detección de SNPs.....	91
Anexo IX. Esquema de los paneles de detección de los SNPs por la metodología SNaPshot visualizados en el software GeneMapper 3.5.	92
Anexo X: Equilibrio de Hardy Weinberg (HW) para individuos LOAD y EAOD y sus controles.	93
Anexo XI. Combinación de genotipos de los SNPs evaluados realizado en Haploview.	96
Anexo XII. Datos de los individuos con EA utilizados en el análisis de correspondencia múltiple.	97
Anexo XIII. Análisis de correspondencia múltiple.	98
Anexo XIV. Grafico de la distribución de variables de bajo riesgo y de alto riesgo para la EA realizado en el programa MDR.	99
Anexo XV. Consideraciones Éticas	100
Anexo XVI. Consentimiento Informado Pacientes	100
Anexo XVII: Consentimiento Informado Controles.....	106
Bibliografía.....	108

Lista de Figuras

Figura 1: Procesamiento amiloide.....	20
Figura 2. Electroferograma de los 10 SNPs utilizando la técnica SNaPshot.	54
Figura 3. Ampliación del SNP GWA_14q32.13 (rs11622883) detectado con el método de SNaPshot.....	55
Figura 4. Bloques Haplotípicos de los SNPs realizados con Haploview para pacientes con LOAD.....	67
Figura 5. Grafico de Análisis de correspondencia múltiple.....	71
Figura 6. Grafico de la distribución de variables de bajo riesgo y de alto riesgo para la EA.....	73

Lista de Tablas

Tabla 1. Revisión de los GWAS publicados en EA.	24
Tabla 2. SNPs evaluados en este estudio en pacientes con EA y controles en Colombia.	43
Tabla 3. Características de los pacientes con LOAD y EAOD y sus controles.	51
Tabla 4. Distribución de los alelos de los 10 SNPs evaluados en pacientes LOAD y EAOD y sus controles.	57
Tabla 5. Distribución de genotipos de los 10 SNPs evaluados en pacientes con LOAD y EAOD sus controles.	58
Tabla 6. Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas en 180 controles con población ASW, TSI, CEU y MEX.	59
Tabla 7. Distribución de alelos y genotipos entre pacientes LOAD, EAOD y sus controles discriminados por subgrupos.	61
Tabla 8. Análisis de asociación para los portadores y no portadores de APOEε4. .	61
Tabla 9. Análisis de asociación entre los 10 SNPs y LOAD	62
Tabla 10. Análisis de asociación entre los 10 SNPs y EAOD.	63
Tabla 11. Comparación de los ORs de los SNPs con otros estudios en EA.	64
Tabla 12. Frecuencias y ORs de los haplotipos conformados entre los marcadores en el programa Haploview.	68
Tabla 13. Combinación de genotipos conformados por TOMM40, APOE ε4 y GWA_14q32.13.	69

Introducción

Múltiples enfermedades presentan un riesgo elevado y variable dentro de las poblaciones humanas llevando consigo un impacto considerable en aspectos de la sociedad y son tema de interés en salud pública. Dentro de estas enfermedades se encuentra la Enfermedad de Alzheimer (EA) que es el tipo más común de demencia, descrita en 1907 por Alois Alzheimer, desde entonces ha sido objeto de extensa investigación básica y clínica (Saunders, Strittmatter et al. 1993; Ferri, Prince et al. 2005; Alzheimer's Association 2009).

Con cada año que pasa más de 4,5 millones de personas en todo el mundo desarrollan demencia. A partir de 2008, se estimó que hay 30 millones de personas en todo el mundo con demencia. En 2050, se proyecta que esa cifra habrá aumentado a más de 100 millones; gran parte del aumento (60%) ocurrirá en los países en desarrollo (Ferri, Prince et al. 2005). Colombia se ubica en los primeros lugares de prevalencia entre muchos países en cuanto a enfermedades neurodegenerativas como la EA, debido a que la tasa de sobrevivencia de la población adulta mayor está en crecimiento, entonces es evidente la necesidad de investigación en el área.

La patología se divide según la edad de aparición de los primeros síntomas; los pacientes con síntomas antes de los 65 años de edad se consideran EA de tipo temprano o familiar (**EAOD** del inglés, early-onset sporadic Alzheimer's disease) y corresponden a aproximadamente el 30% de todos los casos; el otro 70% de los casos son diagnosticados con EA de tipo tardío o esporádico (**LOAD** del inglés, late-onset sporadic Alzheimer's disease), en este caso los pacientes padecen la enfermedad después de los 65 años, es el tipo más frecuente y su prevalencia va en aumento dado el incremento de población de la tercera edad (Saunders, Strittmatter et al. 1993; Tanzi and Bertram 2005; Bertram, Lill et al. 2010).

Por un parte, en EAOD se encuentran algunos genes claves para su desarrollo, como el gen de la Proteína Precursora Amiloide (APP) (cromosoma 21); Presenilina 1 (PS1), (cromosoma 14); y la Presenilina 2 (PS2), (cromosoma 1) causan EA, con alta penetrancia en los portadores de la mutación (Tanzi and Bertram 2005; Coen and Annaert 2010; De Strooper, Iwatsubo et al. 2012). Por otra parte, en LOAD la etiología se considera multifactorial, implicando predisposición genética, además, la edad y múltiples factores ambientales parecen favorecer su desarrollo.

En este tipo de EA ni los factores genéticos ni los ambientales por separado provocan la enfermedad; una interacción sería necesaria para que se desarrolle de

manera inminente la enfermedad. Dentro de los factores genéticos hasta asociados a la EA se halla el gen de la Apolipoproteína E (APOE). Los polimorfismos de APOE (APOEe2, APOEe3, APOEe4) han sido ampliamente estudiados y su frecuencia varía en cada población; sin embargo, desde las primeras asociaciones en 1993 y posteriores replicas se reporta que los individuos con dos copias del alelo APOEe4 presentan mayor riesgo a desarrollar la enfermedad, en comparación con los portadores del alelo e3 (el más común) o el alelo e2 (protector) (Saunders, Strittmatter et al. 1993; Mahley and Rall 2000; Mahley, Weisgraber et al. 2006; Canevari and Clark 2007).

Como APOE, durante muchos años otros factores genéticos han tratado de ser asociados al desarrollo de LOAD alrededor de mundo, incluyendo Colombia, sin tener resultados altamente concluyentes debido a la alta variabilidad entre y dentro de las poblaciones. Esto resalta la importancia de la investigación multidisciplinaria basados en técnicas más novedosas y costo efectivas de búsqueda de variaciones a nivel de DNA que puedan estar asociadas con la EA en nuestro país.

El Grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, se ha encaminado en la búsqueda de factores genéticos relacionados con la EA en la población Colombiana adelantando estudios en genes como BDNF, COMT, UCHL1, TAU, LRP, entre otros (Camelo, Arboleda et al. 2004; Forero, Arboleda et al. 2006; Forero, Benitez et al. 2006), sin tener resultados positivos de asociación aparte de la de la asociación con APOEe4 (Arboleda, Yunis et al. 2001). Desde entonces, continua la exploración de factores genéticos y ambientales de susceptibilidad para la EA en la población Colombiana.

Este estudio presenta gran relevancia debido a que por medio de la metodología de genotipificación SNaPshot se evaluaron además de APOEe2,e3,e4, 10 polimorfismos reportados recientemente en las investigaciones internacionales de Genoma completo (GWAS del ingles , Genome-wide association study) en genes como CLU, BIN1, PICALM, CR1, TOMM40, PVRL2, APOE, SORL1 y GWA_14q32.13 y se permitió establecer un riesgo conferido por TOMM40, GWA_14q32.13 sumado APOEe4 en pacientes Colombianos con LOAD, además factores como la escolaridad y el estado civil podrían estar modulando el desarrollo de LOAD.

Capítulo I. Marco Teórico

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más frecuente, descrita por primera vez por el físico Alemán Alois Alzheimer en 1907. Clínicamente se define por una progresiva pérdida de la funciones cognitivas que finalmente resultan en demencia y muerte (Alzheimer'sAssociation 2009).

La prevalencia difiere entre los países y regiones y también existen diferencias en cuanto a prevalencia por genero, por ejemplo, las mujeres tienen mayor probabilidad de desarrollar EA y otras demencias que los hombres, es así como las mujeres con edad de superior a 71 años tienen tasas de prevalencia de 16% comparado con el 11% de los hombres, esto podría ser explicado por el hecho que las mujeres tienen un tiempo de vida más larga que los hombres (Plassman, Langa et al. 2007).

Además existen diferencias de prevalencia ente los distintos grupos étnicos y raciales. Específicamente, la población de origen latinoamericano tiene 2 veces mayor probabilidad que los de origen europeo de padecer deterioro cognitivo (8.8% y 17.5%, respectivamente), esta diferencia disminuye con el avance de la edad. Los Latinoamericanos con edades entre 65 a 74 años tienen 3.2 veces mayor riesgo que los Europeos de tener deterioro cognitivo, mientras que los Latinoamericanos con edades entre 75 a 84 años tienen 2.4 mayor probabilidad y los ancianos de 85 años solo tienen 1.6 veces mayor probabilidad que los Europeos de tener deterioro cognitivo, esto es concordante con el riesgo de 1.5 mayor de los Latinoamericanos respecto a los Europeos de desarrollar EA y otras demencias (Alzheimer'sAssociation 2010).

Dentro de los cambios macroscópicos que se pueden observar en la EA se encuentran; tamaño medio del cerebro reducido, atrofia cortical considerable y simétrica, con afección en todos los lóbulos, atrofia del lóbulo temporal medio, afectación de las áreas de asociación de manera desproporcionada con respecto a las áreas motoras y sensoriales. Las estructuras subcorticales se hallan normalmente conservadas, excepto la amígdala, que se encuentra gravemente afectada. En general, la atrofia es simétrica entre los hemisferios, aunque no necesariamente entre los lóbulos, además todos los casos de EA desarrollan un déficit de perfusión en las regiones parietemporales posteriores (Hof, Cox et al. 1990).

Neuropatológicamente la EA se caracteriza por agregación y depósitos de proteínas mal plegadas. Particularmente el péptido amiloide ($A\beta$), se agrega en grupos,

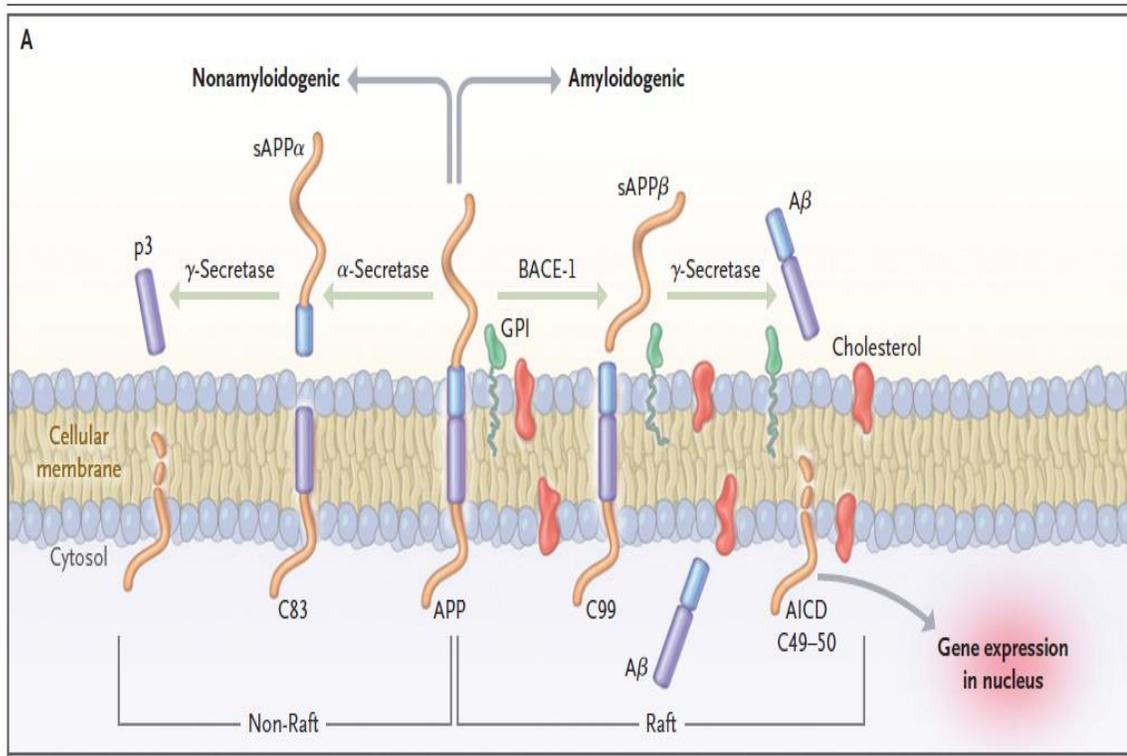
llamados oligómeros, los cuales son acumulados formando depósitos, denominadas placas amiloideas y también la EA se caracteriza por la hiperfosforilación de la proteína tau (t) que forma posteriormente ovillos neurofibrilares (NFTs). Estos cambios se acompañan de daño microvascular, estrés mitocondrial e inflamación de las regiones cerebrales afectadas (Tanzi and Bertram 2005; Bertram, Lill et al. 2010).

En la generación del $A\beta$, es necesaria la proteína precursora amiloide de $A\beta$ (APP), que es clivada en el amino terminal por una proteasa aspartil unida a membrana secretasa o enzima que cliva un sitio β - APP. Este clivaje genera un derivado que es secretado ($APP\beta$ soluble [sAPP β]), un fragmento carboxi terminal unido a membrana de APP (CTF β ; también conocido como C99) y un fragmento CTF β o C89. El clivaje de C99 por la γ - secretasa resulta en la producción de $A\beta_{40}$ y especies de $A\beta_{42}$ descritas anteriormente. Los oligómeros de $A\beta$ se refieren al ensamblaje en dímeros, trímeros etc (Gandy 2005) (Figura 1).

El cerebro amiloide está compuesto por el péptido $A\beta$ de 4 kDa que exhibe micro heterogenicidad en la secuencia de aminoácidos y además de una amplia variedad de estados biofísicos. La mayoría de $A\beta$ está compuesto por un péptido $A\beta_{40}$, $A\beta_{1-40}$ o en algunos casos $A\beta_{x-40}$. Los péptidos tienen diferentes residuos amino terminal, pero igual residuo carboxi terminal (aproximadamente 95%) de todos los $A\beta$ secretados por las células. Una menor fracción (cerca del 5%) de los $A\beta$ terminan en un residuo 42, estas formas "largas $A\beta$ " ($A\beta_{42}$, $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{x-42}$, con diferente amino terminal), son mucho más agregables que $A\beta_{40}$ y estos $A\beta_{42}$ inician la formación de oligómeros, fibras y placas (Younkin 1995; Aleardi, Benard et al. 2005).

Figura 1: Procesamiento amiloide.

Clivaje por α -secretasa y de APP en procesamiento no amiloidogénico que libera un ectodominio ($sAPP\alpha$), dejando un residuo carboxi-terminal (C83) que es digerido por γ -secretasa, liberando a nivel extracelular p3 y un dominio intracelular amiloide (AICD). El procesamiento amiloidogénico es iniciado por β -secretasa (BACE-1), liberando $APP\beta$ y dejando un péptido C99 que también es sustrato de la γ -secretasa, generando $A\beta$ que se agrega para la formación de placas extracelulares y AICD que puede regular la transcripción en núcleo. Glicofosfatidilinositol (GPI). Tomado de (Querfurth and LaFerla 2010).



1.2 Enfermedad de Alzheimer en Colombia

En países en desarrollo como Colombia no se cuenta con un registro adecuado de la prevalencia de desordenes neurológicos como las demencias, siendo este tipo de investigación escaso y solo se destacan estudios sobre la prevalencia de enfermedades neurológicas realizados entre 1983 y 1992 con metodologías similares, basadas en el protocolo para enfermedades neurológicas diseñado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Pradilla AG 1994).

Sin embargo, esos estudios tuvieron algunas limitaciones. Por ejemplo, la mayoría de ellos se llevaron a cabo con muestras pequeñas de población, lo que originó resultados estadísticamente imprecisos; aunque todos se basaron en el protocolo de la OMS, no hubo homogeneidad en la identificación de casos y algunos de los estudios se hicieron en poblaciones expuestas a sustancias tóxicas o con una alta prevalencia de alguna enfermedad neurológica, limitando la posibilidad de extrapolar sus resultados a la población en general (Pradilla AG 2003).

Entre septiembre de 1995 y agosto de 1996 se realizó una encuesta transversal en dos fases, en las cinco regiones geográficas de Colombia, un estudio neuroepidemiológico nacional, denominado EPINEURO. Este tuvo como objetivo determinar las prevalencias de diferentes enfermedades neurológicas, dentro de las que se encontraba la enfermedad de Alzheimer, utilizando los criterios diagnósticos NINCDSADRDA (elaborados conjuntamente por el *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke* y la *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) (McKhann, Drachman et al. 1984). En el caso de la demencia “se detectó solo en personas mayores de 50 años de edad y su prevalencia fue superior en los mayores de 70 años (30,4 por 1000 habitantes). Las regiones más afectadas fueron la sudoccidental y la oriental con 21,9 y 19,3 por 1 000 habitantes, respectivamente” (Pradilla AG 1994).

Este tipo de estudios de prevalencia como el de EPINEURO en Colombia, debe ir de la mano con el conocimiento de las causas genéticas de la patología, demandando una integración cada vez mayor de grupos de investigación básica y clínica, basados en la información del código genético de cada persona, detectando las sutiles influencias de muchos genes en el desarrollo de la enfermedad; con el fin que se pueda intervenir única y exclusivamente en dichas causas, todo esto ayudará a diseñar políticas de salud dirigidas a lograr una prevención más eficaz, un mejor control y un tratamiento más adecuado de la EA.

Diferentes estudios han mostrado que el alelo de APOEε4 es un factor de riesgo Alzheimer esporádico y familiar. A pesar de las frecuencias más altas consistentes de APOEε4 en pacientes de Alzheimer caucásicos; en Hispano/americanos se han encontrado resultados inconstantes, quizás como consecuencia de la variabilidad étnica prominente de hispano hablantes en el mundo.

En Colombia; en el Instituto de genética de la Universidad Nacional, el Grupo de Neurociencias, ha llevado a cabo investigaciones con el gen APOE y la EA en una muestra restringida de la población Caucaésico-mestizo Colombianos. Sin embargo, estas variaciones sólo explican una fracción de los riesgos genéticos asociados con EA y polimorfismos en otros genes pueden conferir riesgo adicional para desarrollar EA (Arboleda, Yunis et al. 2001).

Basados en la contribución biológica potencial a la fisiopatología de la EA, se han analizado genes candidatos potenciales para la EA en Colombia, incluyendo la LRP1(C766T), Tau, el transportador de serotonina (5-HTT, VNTR de 44 bp en la región del promotor, BDNF, COMT, UCHL1(insertión/delección (I/D) de ACE y A2M (Camelo, Arboleda et al. 2004; Forero, Arboleda et al. 2006; Forero, Benitez et al. 2006). Sin encontrar una asociación significativa alélica o genotípica con cualquiera de los polimorfismos analizados, aún usando múltiples análisis estadísticos.

1.3 Genes candidatos de susceptibilidad en la EA

Debido a la complejidad de la EA, diferentes loci pueden afectar vías de señalización asociadas al desarrollo de esta patología, muchos de estos genes se han asociado ampliamente a la producción, agregación y despeje de Aβ, sin embargo, un gran número de estos genes permanecen sin ser dilucidados; la detección de estos e interacciones entre ellos tiene un impacto en la predisposición y desarrollo de la EA en las poblaciones humanas.

En la búsqueda por descubrir la relación de genes en LOAD, mas de 12.000 estudios han arrojado en los últimos 30 años un vasto número de datos en más de 500 genes candidatos que se han considerado como posible factor de riesgo; sin embargo, solo APOE ha tenido resultados consistentes. A pesar de esta asociación, nuevos reportes han elucidado nuevos genes candidatos para EA, pero con resultados contradictorios, poniendo en consideración el rol que cada uno de ellos pueda desempeñar en la aparición de la EA (Bertram, McQueen et al. 2007).

La base de datos AlzGene (<http://www.alzgene.org/>) lista cada día nuevas variantes genéticas con asociación significativa, estas asociaciones se basan en asociaciones alélicas y meta-análisis de todos los datos disponibles publicados en el tema,

incluyendo estudios de gran impacto como los GWAS. Los marcadores en un GWAS consisten en SNPs, que son elegidos con base a su capacidad para cubrir variaciones comunes en el genoma humano, en estos también pueden estar incluidas variaciones en número de copia (VNTRs) (Bertram and Tanzi 2009). Desde el 2007 se cuenta con este tipo de estudios que ha servido como base para realizar diferentes estudios de tipo caso-control en búsqueda de replicas de asociación en diferentes marcadores (Tabla 1).

APOEε4 ha sido considerado importante para conferir riesgo a la EA, sin embargo un grupo creciente de genes han sido estudiados en diferentes regiones del mundo, muchas veces sin tener resultados reproducibles, sin embargo, los meta-análisis sistemáticos han propuesto en la actualidad más de treinta diferentes loci que muestran resultados prometedores. Los resultados señalan que la estructura genética, junto con el sesgo de evaluación resultantes de la asociación de los GWAS con APOE podrían afectar la interpretación y los resultados de algunas asociaciones; así, la interacción de los genes con APOE cada vez toma más relevancia para evitar falsos negativos y falsos positivos de asociación en EA en las poblaciones (Wijsman, Pankratz et al. 2011).

Los estudios de asociación han presentado genes implicados con mecanismos biológicos que tratan de explicar la aparición y desarrollo de la enfermedad; como la hipótesis amiloide, el estrés oxidativo, la inflamación o genes implicados con el riesgo vascular e hipercolesterolemia. Los genes de susceptibilidad no han tenido reproducibilidad significativa, puesto que se reporta una asociación positiva y esta es soportada por riesgos estimados de no más de 1.2, estos resultados son refutados por estudios posteriores que los encuentran como falsos positivos; esto puede estar relacionado con bajo poder de la muestra, insuficiente cobertura de variantes raras y comunes, heterogeneidad alélica o diferencias entre las poblaciones (Sleegers, Lambert et al. 2010).

Tabla 1. Revisión de los GWAS publicados en EA.

GWAS	DISEÑO	POBLACIÓN	CASOS	CONTROLES	No SNPs	GENES ASOCIADOS
Grupe et al., 2007	Caso-control	USA-UK	380	396	17,343	APOE, EBF3, FAM63A, GALP, GWA_14q32.13, GWA_7p15.2, LMNA, LOC651924, MYH13, PCK1, PGBD1, TNK1, TRAK2, UBD
Coon et al., 2007	Caso-control	USA, Países bajos	664	422	502,627	APOE, GAB2
Reiman et al., 2007	Caso-control	USA, Países bajos	446	290	502,627	APOE, GAB2
Li et al., 2008	Caso-control	UK, Canadá	753	736	469,438	APOE, GOLM1, GWA_15q21.2, GWA_9p24.3
Abraham et al., 2008	Caso-control	UK	1082	1239	561,494	APOE, LRAT
Bertram et al., 2008	Estudio en familias.	en USA	941	404	484,522	APOE, ATXN1, CD33, GWA_14q31
Poduslo et al., 2009	Estudio en familias Caso-control	en USA	9	10	489,218	TRPC4AP
Beecham et al., 2009	Caso-control	USA	492	496	532,000	APOE, FAM113B
Carrasquillo et al., 2009	Caso-control	USA	844	1255	313,504	APOE, PCDH11X
Lambert et al., 2009	Caso-control	Europa, UK.	2035	5328	540,000	APOE, CLU (APOJ), CR1
Harold et al., 2009	Caso-control	USA, Europa, UK.	3941	7848	610,000	APOE, CLU (APOJ), PICALM
Potkin et al., 2009	Caso-control	USA	172	209	516,645	APOE, ARSB, CAND1, EFNA5, MAGI2, PRUNE2
Seshadri et al., 2010	Caso-control	USA, Europa, UK.	3006	22604	2,540,000	APOE, BIN1, CLU (APOJ), EXOC3L2, PICALM
Naj et al., 2010	Case-control	USA y Europa.	931	1104	483,399	APOE, MTHFD1L
Wijsman et al., 2011	Estudio en familias	en USA y Europa.	3,839	992	592,532	APOE, CUGBP2, BIN1, CLU, PICALM.

Tomado y modificado de (Bertram, Lill et al. 2010; Hollingworth, Harold et al. 2011).

1.3.1 Apolipoproteína E (APOE)

El colesterol es el mayor regulador de la organización lipídica de la membrana y de su fluidez; los mamíferos han desarrollado complejos y sofisticados mecanismos homeostáticos que funcionan para mantener el colesterol a nivel celular dentro de un rango estrecho. Las alteraciones y/o perturbaciones en estos mecanismos homeostáticos ya sea por mecanismos genéticos, medioambientales o inducidos por la dieta podría perturbar funciones celulares alterada y causar enfermedad (Reid, Urano et al. 2007).

El sistema nervioso central (SNC) contiene cerca del 25% del colesterol total, el cual se encuentra distribuido principalmente en las membranas plasmáticas de las neuronas y las vainas de mielina de los axones. La síntesis de colesterol ocurre principalmente en las células glía, junto con la síntesis de ApoE, la principal lipoproteína en el SNC y otras lipoproteínas como ApoA-I, ApoJ (CLU) y ApoD son importantes en la sinapsis y otros procesos biológicos (Reid, Urano et al. 2007).

El gen de la Apolipoproteína E (APOE) también llamado AD2; LPG; LDLQC5, ha sido implicado en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neurológicas como la EA (Huang 2010). APOE se encuentra localizado en la región 19q13.2, consta de cuatro exones y tres intrones en 3597bp y codifica para una proteína polimórfica de 299aa de 22 kDa, contiene dos dominios estructurales; un dominio N-terminal con un sitio de unión al receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) (residuos 136-150) y un dominio C-terminal que contiene el sitio de unión a lípidos (residuos 240-299) (Mahley 1988; Mahley and Rall 2000). La proteína APOE presenta tres isoformas: APOEe2, APOEe3 y APOEe4 con frecuencias poblacionales de 5–10%, 60–70% y 15–20%, respectivamente. Las isoformas difieren en solo los residuos de aminoácidos 112 y158. La isoforma APOEe3 tiene Cys-112 y Arg-158, la isoforma APOEe4 (rs429358) tiene arginina en ambas posiciones, en esta isoforma la Arg -112 media el dominio de interacción y reduce la estabilidad de la proteína y se encuentra asociada al desarrollo de muchas patologías entre ellas la EA; en contraste, la isoforma APOEe2 (rs7412) tiene cisteínas en esos sitios y es considerada un factor protector para la EA (Weisgraber, Rall et al. 1981; Mahley, Weisgraber et al. 2006).

En LOAD se ha encontrado una fuerte asociación en el genotipo de la APOE. Individuos con dos copias del alelo APOEe4 presentan mayor riesgo a desarrollar la enfermedad, en comparación con los portadores del alelo e3 (el más común) o el alelo e2 (protector) (Canevari and Clark 2007). APOEe4 está implicado con el aumento en la tasa de producción y potenciación de A β , apoptosis y aumento del

clivaje proteolítico en neuronas, convirtiéndose en un blanco terapéutico importante (Mahley, Weisgraber et al. 2006).

APOE ha sido implicado en la deposición o despeje de A β , de manera isoforma dependiente, APOEe4 aumenta la producción de A β mientras APOEe3 lo hace en menor medida, además APOEe4 y APOEe3 tienen diferentes efectos en la fosforilación y agregación de la proteína tau, formando complejos estables con APOEe3 y no con APOEe4 (Mahley, Weisgraber et al. 2006).

Desde que APOE fue descrito como factor de riesgo en la EA ningún otro gen ha demostrado de manera consistente su influencia en la EA (Saunders, Strittmatter et al. 1993). La mayoría de los nuevos genes candidatos han tenido un número de resultados contradictorios; sin embargo, con los recientes estudios de GWAS se ha replicado exitosamente la asociación con APOE y adicionalmente se han encontrado genes como CLU, PICALM, CR1 que han podido también ser replicados en algunas poblaciones (Harold, Abraham et al. 2009).

Dentro de los recientes GWAS que reproducen las asociaciones con APOE se reporta una fuerte asociación entre APOE y otros genes como GALP, TNK1, PCK1 y un SNP en la región 14q32.13(GWA_14q32.13) y LRAT (Coon, Myers et al. 2007; Grupe, Abraham et al. 2007; Abraham, Moskvina et al. 2008). En población caucásica además se muestra asociación con el gen TGEN y otras regiones como GWA_9p24.3 y GWA_15q21.2 (Rohe, Carlo et al. 2008) e igualmente se muestra al gen FAM113B y al gen PCDH11X asociado a EA después de APOE (Beecham, Martin et al. 2009; Carrasquillo, Zou et al. 2009). En estudios realizados en familias también muestra asociación significativa con APOE y la región GWA_14q31.2 (rs11159647) cerca a ATXN1 (Bertram, Lange et al. 2008). Estos GWAS sugieren que hasta hoy APOE es el único gen asociado fuertemente con la EA que puede estar interactuado con otros loci para facilitar el desarrollo de la EA.

1.3.2 Clusterin (CLU)

El gen Clusterin (CLU) también llamado TRPM-2, SGP-2, XIP8, ApoJ o SP 40-40, ha sido implicado en el desarrollo de enfermedades como cáncer (Rizzi and Bettuzzi 2010) y otras como enfermedad de Alzheimer, alfa-sinucleopatías, con clara inmunoreacción con alfa-sinucleína principalmente en demencia por cuerpos de lewy y menormente en enfermedad de Parkinson y atrofia de sistema múltiple (Sasaki, Doh-ura et al. 2002). Estudios realizados han reportado multifuncionalidad

de CLU en la regulación de apoptosis, interacciones célula-célula, estabilidad proteica, señalización celular, proliferación y transformación. Además de estar implicado en diferentes tipos de cáncer como próstata y seno (Rizzi and Bettuzzi 2010).

Desde antes de la caracterización molecular de CLU en 1994, la proteína había sido relacionada con una cantidad de procesos biológicos como señalización celular, transporte de lípidos, maduración de esperma, remodelamiento de membrana e inhibición del sistema complemento. CLU se encuentra en el cromosoma 8 en la región 8p21-p12 y se encuentra organizado en nueve exones y ocupa una región de 16580 bp (Wong, Taillefer et al. 1994)

CLU traduce para una proteína de 60KDa en la forma pre-secretora denominada pre-sCLU que es transportada hacia el retículo endoplásmico desde el polirribosoma, donde se glicosila y cliva en las subunidades α y β unidas por cinco uniones disulfuro; finalmente se produce una proteína madura de 80-kDa que es secretada al espacio extracelular y fluidos corporales; esta proteína madura es altamente conservada en muchas especies animales (Jones and Jomary 2002).

Los receptores de lipoproteínas juegan un rol importante en la determinación de la tasa de flujo de $A\beta$ través de la barrera hematoencefálica, ya sea en su manera libre vía LRP1 y/o formando un complejo con CLU vía LRP2. Otros receptores de lipoproteínas como LDLR que participan en el bajo despacho de $A\beta$ -apoE a través de la barrera permanecen en exploración para caracterizar en rol del transporte apoE/LDLR en el despacho a través de la barrera e interacciones Clu/ LRP2 en regulación de los niveles de $A\beta$ soluble y sus depósitos en el cerebro (Bell, Sagare et al. 2007).

CLU ha sido implicado en el desarrollo de la EA, debido a que dentro su ligandos a parte de lípidos y complemento se encuentra el péptido $A\beta$. Niveles incrementados de la proteína se han encontrado en fluido cerebro espinal y CLU puede mediar el despacho de $A\beta$ por aumento de endocitosis o a través del transporte por la barrera hematoencefálica y con esto influenciar la fibrillogénesis (Nielsen, Mulder et al. 2010). Además CLU ha sido asociado con atrofia del cortex entorrinal, la severidad y rápida progresión clínica de EA. Un incremento en la concentración plasmática de CLU se asocia a una enorme carga de $A\beta$ en el lóbulo temporal medial además de un incremento en el mRNA en sangre demostrando la importancia de CLU en la EA y sugiriendo que alteraciones en proteínas chaperonas de $A\beta$ podrían tener importancia a nivel periférico en EA (Thambisetty, Simmons et al. 2010).

Con los reportes iniciales de GWAS que asocian a CLU con la EA en población caucásica en 2009 en una muestra de 16,000 personas, además de replicar la

asociación con APOE, por primera vez se observa asociación significativa con CLU (rs11136000) y el gen PICALM (rs3851179), sentando las bases de asociación de estos genes con la EA (Harold, Abraham et al. 2009). A partir de este reporte, se ha intentado reproducir estos hallazgos que han mostrado asociación con este gen y otros como el gen del receptor 1 del complemento CR1 encontrando resultados similares de riesgo (Carrasquillo, Belbin et al. 2010; Corneveaux, Myers et al. 2010; Kamboh, Minster et al. 2012).

Dentro de los muchos estudios de asociación que replican asociación con CLU y la EA se encuentran estudios realizados en población china (CLU rs2279590, rs11136000 y rs9331888) y población europea reportando además dos nuevas asociaciones en regiones cercanas en BINI y EXOC3L2/BLOC1S3/MARK4 (Jones, Harold et al. 2010; Seshadri, Fitzpatrick et al. 2010; Yu, Li et al. 2010). Otro GWAS en Francia, Bélgica, Finlandia y España también replicó de asociación de CLU con la EA y el rs11136000 y además riesgo con CR1 con el rs6656401 (Lambert, Heath et al. 2009).

Además de estudios de asociación se han realizado ensayos *in vitro* para entender el rol de CLU en la formación y deposición de placas amiloides. La evidencia sugiere interacción con especies prefibrilares y en grandes cantidades inhibe la formación de placas y ejerce citoprotección sugiriendo que CLU como proteína chaperona es un elemento de gran importancia en el control del mal plegamiento a nivel extracelular (Yerbury, Poon et al. 2007). CLU se encuentra relacionado con activación de microglía, la secreción de agentes neurotóxicos y la fosforilación de tau (Martin-Rehrmann, Hoe et al. 2005; Xie, Harris-White et al. 2005).

1.3.3 Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein (PICALM)

Un paso esencial en la endocitosis y el tráfico intracelular de moléculas es la formación de vesículas mediadas por clatrina. Dentro de los componentes estructurales de las vesículas de clatrina se encuentran las proteínas del complejo adaptador de clatrina o APs que participan en interacción proteína-proteína y actividad enzimática que controla la dinámica de ensamblaje y desensamblaje. Cada AP es un heterotetrámero que está formado por cuatro subunidades, dos largas, una mediana y una subunidad pequeña (Robinson 1997). Uno de los mayores componentes de las vesículas cubiertas de clatrina en el cerebro es PICALM o AP180, en donde sus dominios C-terminal y N-terminal son capaces de

promover el ensamblaje de cubiertas de clatrina *in vitro* además es capaz de unir fosfoinositoles e inositolfosfato en N-terminal (Mao, Chen et al. 2001).

En humanos, PICALM se localiza en el cromosoma 11q23, codifica para una proteína de 652aa que se denomina proteína de ensamble a clatrina, uniendo fosfatidilinositol e involucrada en endocitosis mediada por clatrina. Está implicado en traslocación en leucemia linfocítica y mielocítica y en leucemia linfoblástica aguda de células T (Tebar, Bohlander et al. 1999). Los transcritos de PICALM fueron detectados en todos los tejidos evaluados y se propone a PICALM como un homólogo de AP180 encontrada en invertebrados (Dreyling, Martinez-Climent et al. 1996). Se ha demostrado *in vitro* que la cadena pesada de clatrina es el mayor sitio de unión a PICALM, las interacciones Clatrina–PICALM parece ser regulada por múltiples interfaces de contacto, el dominio C-terminal une la cadena pesada de clatrina, pero toda la proteína completa tiene la máxima habilidad de interacción (Tebar, Bohlander et al. 1999).

El primer GWAS que asocia a PICALM con EA fue realizado en 2009, en este se reporta fuerte asociación de PICALM rs3851179 (Harold, Abraham et al. 2009). A partir de este, estudios recientes intentan reproducir esta asociación en diferentes grupos étnicos. En tres GWAS recientes, uno no asocia el SNP rs3851179 con LOAD en población china, el otro de 3 estados confirma asociación con PICALM y otro GWAS en población Danesa encuentra correspondencia entre EA y rs3851179 (Seshadri, Fitzpatrick et al. 2010; Yu, Li et al. 2010; Mengel-From, Christensen et al. 2011).

PICALM ha llamado la atención como elemento importante en la patología Alzheimer, ya que además de su papel en la endocitosis de clatrina y en tráfico intracelular, entre otras funciones biológicas; existe evidencia que la endocitosis es relevante en la abundancia y distribución de proteínas polarizadas incluyendo acumulación axonal del canal de sodio y proteína de vesícula sináptica. Entonces la endocitosis parece estar involucrada en la selección de proteínas que controlan el proceso de polarización (Sampo, Kaech et al. 2003).

PICALM además de ayudar a establecer la polaridad y control del crecimiento de axones y dendritas en neuronas hipocámpales embrionarias; la reducción de los niveles de PCALM resulta en neuritas distróficas, reducción de endocitosis y disrupción del transporte secretorio y su sobreexpresión genera múltiples axones, surgiendo que PICALM y su función en el tráfico intracelular es esencial para el crecimiento de neuronas (Bushlin, Petralia et al. 2008).

PICALM aunque no se ha asociado claramente a los depósitos de A β podría ser que la endocitosis mediada por PICALM sea importante en el reciclaje de APP (Harel, Wu et al. 2008). Por lo anterior, es preciso determinar si PICALM influencia niveles de A β afectando de alguna manera su absorción y transporte. El transporte de A β en las paredes de los vasos y en la circulación sanguínea es una vía importante de retiro de A β del cerebro y PICALM está situado dentro de las células endoteliales para probablemente participar en este proceso (Baig, Joseph et al. 2010).

1.3.4 Receptor de complemento tipo 1 (CR1)

El receptor de complemento tipo 1 (CR1, CD35 o receptor C3b/C4b) es encontrado en las células de la sangre periférica y en forma soluble en plasma. Esta proteína es capaz de mediar el fenómeno de adherencia inmune que fue descrita por primera vez a inicios de siglo XX (Nelson 1953). Es importante para promover la destrucción microbiana e iniciar una respuesta inmunológica; para llevar a cabo este proceso es elemental el recubrimiento del antígeno con el complemento; una vez ocurre la activación del sistema complemento se lleva a cabo una deposición de C4b y C3b que se unen a CR1, siendo este el receptor de adherencia inmune y sucede el reconocimiento por el receptor de adherencia inmune en la superficie del eritrocito (Smith, Mallin et al. 2002).

CR1 en eritrocitos es el principal vehículo de transporte del complejo inmune de la circulación a células reticuloendoteliales de hígado y bazo. Además CR1 media la adherencia e ingestión de elementos cubiertos con complemento en granulocitos y monocitos/macrófagos, también ocurre interacción entre el sitio de unión C3b de CR1 y una adhesina importante de eritrocitos infectados por *Plasmodium Falciparum*, la interacción llega a una formación de rosetas entre los eritrocitos infectados y no infectados, esto está relacionado con malaria (Smith, Mallin et al. 2002).

CR1 fue mapeado al igual que CR2 en la región 1q32 (Weis, Morton et al. 1987). La proteína CR1 humana es una cadena sencilla de glicopéptido de 1998 aa (~220 kD) y en su forma madura en la superficie celular tiene unidos en N-terminal complejo tri y tetraenarios oligosacáridos, esta región N-terminal está compuesta por 30 repeticiones de 59–72 aa que se pliegan en módulos unidos por secuencias no conservadas de 4 a 8 aa (Klickstein, Wong et al. 1987).

Recientes estudios han demostrado asociación entre EA y polimorfismos en CR1. Se ha encontrado asociación con la EA en población china, europea, portuguesa,

del Reino Unido, población francesa, Italiana y española (Lambert, Heath et al. 2009; Carrasquillo, Belbin et al. 2010; Guerreiro, Beck et al. 2010; Thambisetty, Simmons et al. 2010).

Los componentes del sistema complemento han sido asociados con la EA, dando evidencia de la activación de las vías clásicas y alternativas del sistema complemento por A β y su interacción directa con C3, esto activa microglía y astrocitos; la microglía recluta la placa y puede fagocitarla o puede ser activada para secretar citoquinas proinflamatorias llevando a un proceso inflamatorio que puede acelerar la disfunción neuronal y disminuir el proceso cognitivo (Alexander, Anderson et al. 2008).

Además existe una relación entre ovillos neurofibrilares, placas difusas y la activación de sistema complemento; esta cascada de activación se genera en cerebro con EA pero no en controles. Igualmente se ha visto interacción de A β 42 con C3b lo cual es dependiente del receptor CR1 en eritrocitos para el aclaramiento del péptido, esta interacción difiere en pacientes con EA, MCI (deterioro cognitivo leve) y controles (Rogers, Li et al. 2006). Estos resultados son similares en modelos animales en donde C1q y C3 son asociados a placas amiloides fibrilares, en ratones transgénicos APP (Tg2576) que desarrollan placas amiloides, inflamación y deficiencias comportamentales. En ese estudio los ratones Tg2576 fueron cruzados con ratones con deficiencias en el gen que codifica para C1q (APPQ $^{-/-}$), estos no tienen la habilidad de interacción con A β y tienen un detrimento en la actividad del sistema complemento evidenciada por una reducida acumulación astrocítica y microglial, además de reducción de la pérdida sinaptofisina y MAP2 en la región CA3 (Botto, Dell'Agnola et al. 1998; Fonseca, Zhou et al. 2004). Del mismo modo, se ha estudiado el sistema complemento en el desarrollo de la neuropatología usando inhibidores de la activación del sistema complemento inducida por A β , resulta en una disminución de los depósitos amiloides, disminuyendo las astrogliosis en ratones transgénicos APP23 (Bergamaschini, Rossi et al. 2004).

1.3.5 Sortilin-related receptor (SORL1)

SORL1 cuenta con diferentes nombres como sorLA, sor11 y LR11, el gen se encuentra en la región 11q23.2-q24.2 y codifica para una glicoproteína expresada en muchas neuronas del cortex, hipocampo, cerebelo y cordón espinal (Fiete, Mi et al. 2007). La proteína SORL1 es una molécula compleja con múltiples dominios que incluye un dominio VPS10 y dominios de receptor de lipoproteína de baja densidad. En mamíferos, se expresa una familia de 5 proteínas que contienen VPS10, que

junto con SORL1, incluyen sortilina, sorCS1, sorCS2 y sorCS. Como todos los miembros de la familia son receptores transmembrana tipo I, se propone que la familia de proteínas VPS10 podrían funcionar como receptores de la vía neuronal del retromero (Seaman 2005). La vía del retromero fue descrita por primera vez en levadura, esta vía consiste en un complejo multimérico de VPS35, VPS26, VPS29, VPS5, and VPS17. Este complejo une y transporta al receptor transmembrana VPS10 del endosoma a la red trans-golgi (Haft, de la Luz Sierra et al. 2000).

El primer estudio que encontró asociación de SORL1 y EA incluyó más de 6000 individuos de cuatro diferentes grupos, se identificaron dos sets de haplotipos en la región 5' del gen SORL1 entre Latinoamericanos, Europeos y árabes y en la región 3' entre Caucásicos y africanos; estos resultados indicaron que hay distintas variantes alélicas en diversas regiones del gen SORL1 en las poblaciones y estas variantes pueden alterar el papel de SORL1 en el desarrollo de la EA a través del procesamiento de APP (Rogaeva, Meng et al. 2007).

Estudios caso-control han encontrado asociación entre SORL1 y EA en población Belga, China, Japonesa, africana y de reino unido (Lee, Cheng et al. 2007; Bettens, Brouwers et al. 2008; Li, Rowland et al. 2008; Kimura, Yamamoto et al. 2009; Tan, Lee et al. 2009). También hay reportes de no asociación con la EA ni asociación con genotipo APOE en los SNPs estudiados de SORL1 en diversas poblaciones (Liu, Arias-Vasquez et al. 2007; Rohe, Carlo et al. 2008; Shibata, Ohnuma et al. 2008).

GWAS recientes también sugieren asociación entre variantes SORL1 y EA. Por ejemplo, en población francesa se muestra asociación de TFAM, SORL1, CHRN2, SORCS1, DAPK1, MTHFR, GWA 14q32.13, BDNF y EA (Laumet, Chouraki et al. 2010). En población alemana los rs4935774 y rs1614735 tuvieron asociación al igual que SNPs que no habían sido reportado antes (rs12576704, rs10502262 y rs3781835)(Feulner, Laws et al. 2010).

Se pueden utilizar diferentes métodos de análisis para evaluar la asociación de la vía del retromero con EA por ejemplo estudios en cultivos celulares en los que se manipula molecularmente los elementos relacionados con la vía y se evalúa su relación en la producción de A β , además se puede hacer uso de ingeniería genética con modelos animales y evaluar la deficiencia o sobreexpresión de SORL1 en la producción del péptido amiloide y finalmente estudios genéticos que pueden testear variaciones en los genes relacionados con la vía del retromero y el desarrollo de la EA (Small MD et al., 2008).

La sobreexpresión de SORL1 induce cambios en las neuronas, en la localización subcelular de la APP en el aparato de Golgi y la producción de A β secretada, demostrando que de alguna manera SORL1 interactúa con APP (Andersen, Reiche et al. 2005). SORL1 podría mediar el transporte de APP a través de Golgi, posiblemente bloqueando el acceso de BACE a APP y por su puesto inhibiendo el clivaje de APP en ese sitio. SORL1 en su forma completa es más eficiente que su parte C-terminal en la acción en BACE; es posible que las interacciones entre el dominio luminal de SORL1 y el dominio luminal de de APP contribuye a proteger del clivaje de BACE. La retención de APP mediada por SORL1 es importante en determinar la cantidad de precursor que se libera en la vía secretora por procesamiento proteolítico de A β . Es posible que SORL1 contribuya al transporte retrogrado de BACE en Golgi ya que SORL1coimmunoprecipita principalmente con formas inmaduras no glicosiladas de BACE puntos para una interacción en Golgi (Spoelgen, von Arnim et al. 2006; Lee, Barral et al. 2008).

En modelos transgénicos con deficiencias en SORL1 se observa un incremento en los niveles de producción de A β y formación de placas en los animales (Offe, Dodson et al. 2006; Rohe, Carlo et al. 2008). También la relación de SORL1 se ha visto en CSF (Fluido cerebroespinal) de pacientes EA, correlacionando niveles reducidos de SORL1 con APP pero no con APOE, señalando a SORL1 como un potencial biomarcador de diagnostico en pacientes EA (Andersen, Reiche et al. 2005; Ma, Galasko et al. 2009).

En general, muchos estudios soportan fuerte evidencia de asociación de SORL1 y EA, entonces se considera como un potencial terapéutico para pacientes con LOAD. Para lograr esto es necesario precisar las variantes genéticas de SORL1 y su riesgo o protección a EA y de la misma manera determinar la interacción de estas variantes y el ambiente. Todo esto será posible si se clarifica el mecanismo de transporte intracelular y procesamiento a través del cual SORL1 actúa en el trafico de la proteína APP para finalmente caracterizar las vías moleculares en las que está involucrado SORL1 (Lee, Barral et al. 2008).

1.3.6 Translocase of outer mitochondrial membrane 40 (TOMM40)

Existe evidencia entre disfunción mitocondrial y la enfermedad de Alzheimer, que además de caracterizarse por acumulación de A β , presenta disminución en el potencial de membrana mitocondrial, estrés oxidativo, disminución de la actividad citocromo oxidasa c y alteración de la morfología mitocondrial (Hauptmann, Keil et al. 2006).

La entrada de proteínas en la mitocondria es un proceso importante para la biogénesis de los orgánulos y para la viabilidad celular. En la superficie de la mitocondria los precursores de proteínas son reconocidos por traslocasas de la membrana externa mitocondrial, esto es el complejo TOM y está involucrado en la integración de precursores de las proteínas de membrana externa en la membrana. Está compuesto por al menos siete subunidades. TOMM20 (20 kDa) y TOMM 70 (70 kDa) son los receptores primarios que reconocen la información blanco en precursores mitocondriales, mientras que las subunidades TOMM22, TOMM7, TOMM5, TOMM6 y TOMM40 forman el núcleo estable del complejo TOM. TOMM40 forma un canal de ~20 Å de diámetro que no permite el paso de proteínas plegadas; este canal conduce proteínas clivadas y no clivadas del complejo TOM (Pfanner and Wiedemann 2002; Rapaport 2005). Después de pasar a través del complejo TOM, las proteínas se ordenan a través de una serie de mecanismos, ya sea directamente a la membrana externa, espacio intermembranal o la traslocasa de la membrana interna (TIM); TIM23 media la maquinaria de traslocación de proteínas hacia la matriz y TIM22 media la maquinaria de inserción hacia la membrana interna (Koehler 2000).

El mecanismo posible en el que A β es tóxico para la mitocondria, es evidenciado por una disminución de enzimas como COX, α -cetoglutarato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa en presencia del péptido amiloideo alterando las propiedades de la mitocondria en pacientes EA (Casley, Canevari et al. 2002). Además, A β también influye en la inhibición de los complejos de la cadena respiratoria, incrementando la producción de H₂O₂, potenciando los niveles de ROS e incrementando los niveles de citocromo c (Aleari, Benard et al. 2005; Maruszak and Zekanowski 2011).

APP necesita interactuar con complejos de las traslocasas mitocondriales. Una de ellas es TOMM40, el gen se encuentra en la región cromosómica 19q13.2 y contiene 9 exones en cerca de 12 Kb y se encuentra en LD (desequilibrio de ligamiento) con APOE en el cromosoma 19 (Lai, Riley et al. 1998; Yu, Seltman et al. 2007; Roses, Lutz et al. 2010). APOE muestra interacción con la mitocondria, específicamente fuera de la membrana y APOE o fragmentos de este inducen a toxicidad mitocondrial y reduce la movilidad mitocondrial (Chang, ran Ma et al. 2005).

TOMM40 colocaliza con APP dentro de la mitocondria en cerebros de pacientes EA y se observa alta acumulación de APP en individuos portadores del genotipo APOE ϵ 3/4, soportando la hipótesis que el genotipo APOE influencia el transporte de

APP en la mitocondria y APP que para llegar a estas necesita interactuar con TOMM40, de esta manera se sugiere a este como gen candidato importante en el desarrollo de EA (Devi, Prabhu et al. 2006).

Recientes estudios demuestran que hay una longitud variable deoxitimidina (poli-T) entre el intron 6 de TOMM40 en la región cercana de APOE que está asociado con LOAD. Esos datos explican la media de la edad de inicio de la enfermedad para pacientes con genotipo APOEε4/ε4 y diferencia dos polimorfismos de poli-T TOMM40 unidos a APOE, de esta manera cada forma se encuentra asociada a una distribución de edad de inicio diferente (Roses 2010). La unión de APOEε3 con las repeticiones poli-T largas en TOMM40 (19-39 nucleótidos) en rs10524523 se asociada con inicio temprano de la enfermedad y las repeticiones cortas poli-T TOMM40 (11-16 nucleótidos) se encuentran asociadas a edad de inicio tardío de la enfermedad, sugiriendo que estas formas son codominantes con el fenotipo de la edad de inicio de la EA pero con expresividad variable (Roses 2010).

Estudios caso-control y GWAS han sugerido a TOMM40 como factor importante para el desarrollo de la EA. Un mapeo fino en la región de APOE en población Japonesa encuentra asociación con LOAD y fuerte LD con variantes en los genes PVRL2, TOMM40, APOE y APOC1 e igualmente se encuentra alto LD entre variantes de TOMM40 y APOE en población caucásica (Yu, Seltman et al. 2007; Takei, Miyashita et al. 2009). Un GWAS en 2032 casos de AD y 5328 controles de ascendencia francesa muestra alta significancia en genes involucrados en procesos de transporte intracelular transmembrana de proteína como NUP98, TRAM, NUPL2, TIMM44 y TIMM17A, pero la mayor significancia fue observada con TOMM40 que además se correlaciona con PSEN2 (Hong, Alexeyenko et al. 2010); otro GWAS en población Alemana muestra asociación con los SNPs rs157580 and rs2075650 de TOMM40 y además fuerte LD con polimorfismos del promotor de APOE (Feulner, Laws et al. 2010), estos estudios sugieren que TOMM40 podría ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de la EA.

1.3.7 Poliovirus receptor-related 2 (PVRL2)

PVRL2 es el homólogo humano de PVR murino, es conocido como HVEB; PRR2; CD112; PVRR2 se encuentra en la región 19q13.2-q13.4, es centromérico a TOMM40 y APOE. Presenta dos isoformas de mRNA de 3.0 kb (PVRL2- alfa) y 4.4 kb (PVRL2- delta) las cuales son encontradas en diferentes tejidos (Eberle, Dubreuil et al. 1995).

El poliovirus es un miembro de la familia de Picornavirus y es el agente causal de la poliomielitis. La cápside de cada uno de los tres serotipos de polivirus consiste de sesenta copias de cada polipeptido viral VP1, VP2, VP3 y VP4. El receptor de polivirus (PVR) que es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, es usado por los tres serotipos virales para iniciar la infección de células (Racaniello 1996). El polipeptido PVR contiene una secuencia señal, tres dominios extracelulares parecidos a inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática.

Tanto PVRL1 (11q23) como PVRL2 median sus propias uniones homofilicas y la unión a Afadina, ambas reacciones desempeñan un papel importante en conexiones celulares mediadas por clatrina. Ellas son expresadas en la superficie de las células hematopoyéticas y endoteliales. PVRL1 y PVRL2 puede ser detectado en 50% y de 20-60% en medula ósea o sangre periférica respectivamente. PVRL2 podría participar en reacciones de adhesión, en migración trasendotelial de monocitos y en regulación de funciones intracelulares a través de señales de transducción. Estas dos moléculas participan en la patogénesis de leucemia mieloide aguda (AML) mediante manifestaciones extramedulares o influencia en funciones intracelulares entre células malignas e inmunoreactivas y pueden ayudar a determinar diagnóstico (Lopez, Aoubala et al. 1998).

Variaciones en el gen PVRL2 se han visto asociadas a enfermedades como la enfermedad coronaria. La variación Sau96I (A/G) tiene relación con los alelos de APOE y enfermedad coronaria en población caucásica en un estudio caso-control. El alelo de riesgo A se encuentra en LD con APOEε4 y el alelo G con APOEε2 que se encuentra expresado a la baja en el grupo de pacientes (Freitas, Phan et al. 2002).

En cuanto a EA, PVRL2 también ha reportado asociación. Un análisis de LD alrededor de APOE, mapeó la región de APOE (cerca de 200kb) en población japonesa usando 260 SNPs, encontrando que los genes PVRL2, TOMM40 y APOC1 presenta alto LD con APOE, estos hallazgos también son encontrados en población caucásica y sugieren a estos genes importantes para predisposición a EA (Yu, Seltman et al. 2007; Takei, Miyashita et al. 2009).

Finalmente, recientes GWAS sugieren asociación de la EA con PVRL2. El rs6859 ha sido asociado con LOAD en 1,082 casos y 1,239 controles, igualmente se confirma asociación con APOE y TOMM40 y el mismo GWAS que reporta asociación con PICALM y CLU en 16.000 individuos confirma asociación con rs6859 de PVRL2 y la EA en población africana (Harold, Abraham et al. 2009; Logue, Schu et al. 2011).

1.3.8 Bridging integrator 1 (BIN1)

El gen BIN1 también como amphiphysin2 (AMPH2) cuenta con 19 exones y codifica para una proteína con características de proteína supresora de tumor, (Negorev, Riethman et al. 1996; Wechsler-Reya, Sakamuro et al. 1997). Se expresa principalmente en musculo esquelético y pineal; está involucrado en la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina y se une a dinaminas que regulan la red de clatrina incluyendo la dinamina 2 (DNM2), las adaptinas 1y 2(AP2A1 y AP2P2)(Carter 2011).

BIN1 participa en la fagocitosis en macrófagos y se asocia transitoriamente con fagosomas tempranos, sin embargo, es retenido en vacuolas que contienen *Chlamydia pneumoniae*, un efecto que reduce la capacidad del sistema macrófago para matar las bacterias a través generación de óxido nítrico (Carter 2011). Además de la relación de BIN1 con la maquinaria mediada por clatrina también regula la expresión de indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1), una enzima que cataliza el primer paso limitante en el metabolismo del triptófano. La sobreexpresión de IDO1 es un mecanismo de defensa contra patógenos, muchos de los cuales son incapaces de sintetizar triptófano, es así como su supervivencia se ve comprometida por el desvío de triptófano metabolismo a las quinureninas(Gulaj, Pawlak et al. 2010).

IDO1 además de estar involucrada en la respuesta a patógenos y parásitos como *T. Gondii*; en EA la proteína IDO1 se localiza en placas y ovillos neurofibrilares y la activación de IDO1 permite la producción tóxica de derivados del triptófano tales como agonistas del receptor N-metil D aspartato y la neurotoxina excitatoria: ácido quinolinico (Widner, Leblhuber et al. 2000; Gulaj, Pawlak et al. 2010).

Bin1 está relacionado en enfermedad autosómica recesiva de miopatía centronuclear, se han encontrado tres diferentes mutaciones homocigotas que podrían interferir con el remodelamiento de los tubulos T, membranas endocíticas y podrían alterar la interacción entre BIN1 y DNM2 necesaria para la función muscular normal (Nicot 2007). Además la pérdida de expresión de BIN1 parece ser frecuente en carcinomas humanos hepatocelulares (Nicot 2007).

En EA no es clara la función de BIN1, sin embargo BIN1 al igual que PICALM ha estado asociado a la endocitosis mediado por receptor (RME). RME es el proceso por el cual los ligandos externos se unen a los receptores en la superficie celular externa y la membrana plasmática se invagina para formar las vesículas de clatrina que finalmente son internalizadas en la célula (Grant BD 2009). Los contenidos del

endosoma formado pueden reciclarse en la célula o los endosomas pueden fusionarse con los lisosomas para degradar su contenido. RME es ampliamente controlado por la interacción ligando-receptor, RME está involucrado en la internalización y transporte de lípidos como el mediado por las lipoproteínas APOE y CLU y es un componente importante en el reciclaje de vesículas sinápticas (Grant BD 2009).

BIN1 parece vincular los microtúbulos del citoesqueleto con la membrana celular a través de las estructuras tubulares de la membrana y esto podría influenciar la formación de ovillos neurofibrilares característicos de la EA (Jones, Harold et al. 2010).

La asociación de BIN1 con la EA ha sido reportada en diferentes estudios incluyendo GWAS junto con variantes en APOE, CLU y PICALM. L (Seshadri, Fitzpatrick et al. 2010; Lee, Cheng et al. 2011; Wijsman, Pankratz et al. 2011). La asociación de BIN1 con la EA ha sido replicada en población Africana y Europea (Carrasquillo MM 2011; Logue, Schu et al. 2011).

Capítulo II. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar la asociación de los genes CLU (rs11136000 y rs2279590), PICALM (rs3851179), CR1 (rs381861), TOMM40 (rs2075650), PVRL2 (rs6859), APOE (rs440446), SORL1 (rs11218304), BIN1 (rs744373) y GWA_14q32.13 (rs11622883) en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en una muestra de pacientes Colombianos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar frecuencias alélicas y genotípicas de los genes CLU (rs11136000 y rs2279590), PICALM (rs3851179), CR1 (rs6rs381861), TOMM40 (rs2075650), PVRL2 (rs6859), APOE (rs440446), SORL1 (rs11218304), BIN1 (rs744373) y GWA_14q32.13 (rs11622883) en el grupo de pacientes con EA y controles.
- Comparar el grupo de pacientes y el grupo de controles a fin de identificar si existen diferencias entre los genotipos para cada SNP.
- Determinar los alelos e2, e3 ye4 del gen APOE en el grupo de pacientes y controles, estableciendo su posible asociación con los SNPs estudiados.
- Conformar haplotipos entre los diferentes SNPs, estableciendo los posibles riesgos para el desarrollo de la EA en nuestra muestra Colombiana.
- Fortalecer el programa Nacional de Investigación en Genómica, Bioinformática y Estadística para estudios en enfermedades Neurosiquiátricas. Fase I: Enfermedad de Alzheimer en nuestro país.

Capítulo III. Materiales y métodos

3.1 Pacientes y Controles

El Grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia cuenta con aproximadamente 600 pacientes con diagnóstico de demencia, 280 con EA y 300 controles, estos últimos sin antecedentes personales ni familiares de enfermedades neurodegenerativas y/o psiquiátricas. La muestra de sangre de pacientes y controles ha sido tomada con previo consentimiento informado (Anexos XV, XVI y XVII) y las historias clínicas de los pacientes, controles y familiares permanecen de manera confidencial en las instalaciones en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional. Las muestras de sangre tomadas son codificadas y almacenadas a - 70 ° C hasta su utilización.

3.2 Determinación de variaciones de interés (SNPs)

Los SNPs analizados en los genes CLU, PICALM, CR1, APOE, TOMM40, PVRL2, SORL1, BIN1 fueron escogidos mediante revisión bibliografía de estudios de genoma completo (GWAS) y replicas que hayan reportado asociación significativa con la enfermedad de Alzheimer en regiones distintas a Colombia, además de estudios funcionales que hayan demostrado una potencial asociación funcional de los genes candidatos con vías metabólicas involucradas en el desarrollo de la patología Alzheimer. Se tuvo en cuenta el riesgo asociado (OR) y estadísticos reportados en los meta-análisis de la base de datos ALZGENE (<http://www.alzgene.org/>) que se encuentra relacionada en ALZFORUM (<http://www.alzforum.org/>). Los SNPs escogidos se encuentran consignados en la Tabla 2.

Tabla 2. SNPs evaluados en este estudio en pacientes con EA y controles en Colombia.

SNP	Cromosoma	Gen	Localización relativa al gen	Alelos	MA F	OR 95%CI
rs1113600	8	CLU	Intrón	C/T	T	0.86 (0.82–0.90)
rs3851179	11	PICALM	5´	A/G	A	0.87 (0.83–0.91)
rs2279590	8	CLU	Intrón	A/G	A	0.86 (0.81,0.90)
rs744373	2	BIN1	-----	C/T	C	1.17 (1.13,1.20)
rs2075650	19	TOMM40	Intrón	A/G	G	2.79 (2.38,3.27)
rs6859	19	PVRL2	3´ UTR	A/G	A	1.50 (1.39,1.62)
rs440446	19	APOE	Intrón	C/G	C	0.57(0.50,0.65)
rs1121830	11	SORL1	Intrón	A/G	G	1.13 [1.02,1.25]
rs3818361	1	CRI	Intrón	C/T	T	1.19 (1.11–1.26)
rs1162288	14	GWA_14 q32.13	Cerca SERPINA	A/T	A	0.84 (0.69,1.06)

MAF: alelo de menor frecuencia; OR reportado en ALZGENE (<http://www.alzgene.org/>)

3.3 Aislamiento de ADN genómico

Inicialmente se realizó una evaluación de calidad del DNA genómico previamente extraído y conservado a 4°C de pacientes y controles; por medio de electroforesis en geles de agarosa 0.8%, teñidos con SYBR® Safe DNA Gel y visualizados con luz U.V, para esto se usó 5µl de muestra de DNA y 5µl de buffer de carga (Azul de bromofenol 2x). Las muestras con poco o nulo DNA fueron descartadas y nuevamente extraídas, al igual que las muestras recientemente tomadas por los clínicos que no contaban con DNA aislado.

Las muestras de sangre de pacientes y controles inicialmente fueron procesadas mediante el método de Salting Out (Miller, Dykes et al. 1988). Brevemente, la sangre es sometida a una serie de procesos de lisis osmótica con buffers salinos hipotónicos y detergentes. Se inactivan las proteasas y DNAsas por medio de una digestión con proteinasa K, luego se precipitan las proteínas con una solución saturada de Cloruro de Sodio, posteriormente se precipita y deshidrata el DNA con lavados en Isopropanol y Etanol. Por último la muestra es rehidratada. Uno de los

principales inconvenientes con esta técnica es la correcta eliminación de proteínas e inhibidores de PCR, además del tiempo de duración de la extracción; por esta razón fue adquirido un kit de extracción de DNA Quick-gDNA™ MiniPrep que permite la resolución de estos inconvenientes y muchas de las muestras fueron extraídas por este método.

3.4 Diseño de Primers

Para identificación de los SNPs en CLU, BIN1, PICALM, CR1, TOMM40, PVRL2, APOE, SORL1 y GWA_14q32.13 se diseñaron tres primers para cada una de las variaciones; los primeros dos primers fueron utilizados para la amplificación por PCR multiplex y su diseño se hizo mediante el programa **MPprimer** (<http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/>) y **Primer 3** (<http://frodo.wi.mit.edu/>); estos programas diseñan y evalúan primers, determinando las optimas condiciones de set de primers y siguiendo una cuidadosa exanimación para evitar la dimerización de los primers (Anexos I y II). Se realizó el diseño para tres PCR multiplex de la siguiente manera:

PCR 1: CLU(rs11136000), PICALM(rs3851179), CLU(rs2279590) y BIN1 (rs744373)

PCR 2: TOMM40 (rs2075650), PVRL2 (rs6859) y APOE (rs440446)

PCR 3: SORL1 (rs11218304), CR1 (rs3818361) y GWA_14q32.13 (rs11622883)

El tercer primer se utilizó en la reacción de SNaPshot y fue diseñado según especificaciones de SNaPshot Multiplex protocol de Applied Biosystems, de manera que se diseñaron primers con 4 a 6 nucleótidos de diferencia, se adicionaron colas de polinucleotidos en el extremo 5` poly (dA) para los primers menores a 64bp y poly (dGACT) para los de mayor tamaño. Los primers presentan una temperatura de melting entre 48° y 50° ya que la temperatura de annealing de la reacción de SNaPshot recomendada es de 50 °C. Además se analizó la posible formación de hairpin para cada primer y la posible formación de dímeros entre primers mediante en el programa **OligoAnalyzer** 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>)

3.5 PCR multiplex

Las PCRs multiplex fueron estandarizadas de acuerdo con su temperatura de melting y concentración de cloruro de magnesio (Anexo III y IV). Una vez ajustadas las condiciones optimas de cada una de las tres PCRs fueron realizadas en el grupo de pacientes y controles. Las verificaciones de amplificación se realizaron en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con SYBR® Safe DNA Gel y visualizado con U.V.

Posterior a las amplificaciones, el set de amplificaciones de cada muestra fue mezclado en un solo tubo eppendorf y purificado con las enzimas fosfatasa alcalina (5 Unidades en 15µl) y exonucleasa I (2 Unidades en 15 µl) con un periodo de incubación a 37 C durante 1 hora y 75C durante 15 min; esto con el fin de eliminar el posible exceso de dNTPs y algunos dimeros de primer. Estos productos purificados fueron usados para el procedimiento de genotipificación mediante la técnica de SNaPshot.

3.6 Técnica de identificación de SNPs (SNaPshot)

Este proyecto se propuso hacer un avance en los procesos de identificación de SNPs, haciendo del secuenciador automático ABI PRISM 3500 y el sistema SNaPshot® Multiplex adquirido recientemente por el Grupo de Neurociencias en el “Programa Nacional de Investigación en Genómica, Bioinformática y Estadística para estudios en enfermedades Neurosiquiátricas. Fase I: Enfermedad de Alzheimer”.

El procedimiento de SNaPshot tuvo como primer paso de estandarización el uso del SNaPshot primer focus kit que permite analizar los primers individuales para reconocer los genotipos respectivos, entre cada primer hay de 4 a 6 pares de bases (bp) de diferencia aproximadamente y el uso de este kit reconoce sus localizaciones aproximadas antes de llevar a cabo la genotipificación final de los 10 SNPs. Este paso con SNaPshot primer focus fue realizado según las especificaciones del Kit y una examinación con el software GeneMapper 2.0 permitió establecer si dos o más primers se encontraban sobrelapados; si ningún primer se sobrelapa se puede realizar la correcta asignación de genotipos en la técnica de SNaPshot. La prueba de SNaPshot primer focus permitió realizar paneles en el software GeneMapper 2.0 para ver los grupos de marcadores, cada panel contiene Bins set que consta de una colección de Bin, estos denotan la medida de los fragmentos en pares de bases (bp) y por fluoroforo de cada uno de los nucleótidos en los 10 SNPs. Este ensayo permitió establecer que dos primers se sobrelapaban y por esto se realizó un nuevo diseño de estos primers.

La reacción de SNaPshot Multiplex Kit consiste en un Mix de reacción, pool de productos de PCR mezclados y purificados de cada muestra y un pool con los 10 primer; además se hace un control positivo y un control negativo según las especificaciones del kit (Anexo VI). Esta mezcla se coloca bajo unas condiciones de termociclaje recomendadas en el kit (96° por 15 seg, 56° por 5 seg y 60° 30 seg en 25 ciclos) y finalmente los productos son purificados con 1Unidad fosfatasa alcalina a 37 C durante 1 hora y 75C durante 15 min.

Los productos de la reacción de SNaPshot fueron analizados en el 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA), realizando previamente una mezcla de la reacción de SNaPshot, GS120 Liz Size Standard y Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Foster City,USA) con una posterior denaturación a 95°C por 5 min. Los análisis de genotipos se realizaron mediante el software GeneMapper 3.5 (Applied Biosystems, Foster City, USA). La determinación de los genotipos fue realizada por el programa mediante el reconocimiento de la posición y los alelos para cada uno de los SNPs. Una vez el programa determinó los genotipos se realizó una revisión manual de cada SNP para todos los individuos y si se obtenía un genotipo dudoso por altura del pico en el electroferograma se eliminaba el resultado de genotipificación dudoso.

3.7 Identificación de genotipos APOE

La identificación de los alelos APOEe2, APOEe3 y APOEe4 fue realizada como lo describe (Saunders, Strittmatter et al. 1993). Brevemente, se realiza una amplificación con PCR con los primers descritos forward (5'-ACAGAATTCCGCCCCGGCCTGGTACAC-3') y primer reverse (5'-TAAGCTTGGACGGCTCCAAGGA-3') y las condiciones específicas de amplificación (Anexo V), estos productos son comprobados en gel de agarosa al 1%, teñidos con SYBR® Safe DNA Gel y visualizados con luz U.V. Posteriormente los productos fueron procesados con la metodología RFLPs, usando la enzima de restricción HhaI (New England Biolabs) a 37°C por 16 horas y el resultado fue visualizado en geles de agarosa al 4% en preparaciones de agarosa Nusieve 1.6%, agarosa Metaphore 1.6%, agarosa Seaken 0.8%, estos geles fueron teñidos con SYBR® Safe DNA Gel y visualizados con luz U.V.

3.8 Estadísticos

3.8.1 Frecuencias alélicas y Genotípicas

En los estudios caso-control se comparan las frecuencias alélicas y genotípicas de los diferentes marcadores evaluados entre los grupos. De manera que una diferencia en la frecuencia alélica o genotípica de un determinado SNP en casos en comparación con los controles podrían indicar que la presencia de un alelo de un SNP podría modificar el riesgo de la enfermedad (Lewis 2002).

La estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas se realizó por conteo directo en el grupo de pacientes y controles. Se realizó una comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de los SNPs con otras poblaciones reportadas en el HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) como: **ASW (A)**: African ancestry in Southwest USA; **TSI (T)**: Tuscan in Italy; **CEU (C)**: Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection; **MEX (M)**: Mexican ancestry in Los Angeles, California (Tabla 6).

Los datos disponibles de genotipos para cada SNP en los individuos fue dispuesta en formato estándar PED y MAP para el análisis posterior en el software PLINK³² (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

3.8.2 Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE)

El equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) es usado para entender las características genéticas de las poblaciones. HWE establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúen factores como la selección natural, migraciones y las mutaciones, que hay apareamiento al azar y que los alelos no afectan la fertilidad (Wittke-Thompson, Pluzhnikov et al. 2005). HWE establece que si p es el alelo de mayor frecuencia (A) y q el alelo de menor frecuencia (a) para un locus bialélico, entonces la frecuencia esperada para HWE será p^2 para el genotipo AA, $2pq$ para el genotipo Aa y q^2 para el genotipo aa y esto debería ser igual a 1 (Wittke-Thompson, Pluzhnikov et al. 2005). El HWE fue determinado en la muestra por un test χ^2 en el programa PLINK. El nivel de significancia para declarar un SNP en HWE varía entre los estudios (p-value entre

0.001 y 5.7×10^{-7}) (Anderson, Pettersson et al. 2010). En este estudio se tomó como desviación de HWE un p-value < 0.001 .

3.8.3 Test de asociación

Los test de asociación genética se realizan para cada SNP, bajo la hipótesis nula de no asociación con la enfermedad se espera que las frecuencias alélicas o genotípicas sean las mismas en el grupo de pacientes y controles (Geraldine M Clarke 2011). El test de asociación se realizó mediante un χ^2 basado en una tabla de contingencia de 2x3 para el conteo de genotipos en casos y controles, se usó el programa PLINK para llevar a cabo el test de asociación.

El factor de riesgo para casos Vs controles esta dado por cada SNP. Para esto se estimaron los Odds Ratio (OR), esto es, la probabilidad que la enfermedad se presente comparado con la probabilidad que esté ausente en casos Vs controles. En caso de ser mayor a 1 se puede decir que el alelo o genotipo es de riesgo, pero si por el contrario es menor a 1 se considera protector. Los OR para los SNPs y haplotipos se realizaron con PLINK y Haploview (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>). Para evitar errores Tipo I (Probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es cierta) en los test de asociación, se realizó corrección de Bonferroni ($\alpha^* = \alpha/n$). Si $\alpha = 0.05$ y en este estudio tenemos 12 marcadores (incluyendo los dos que determinan APOE₂,₃,₄) entonces $\alpha^* = 0.05/12 = 0.0041$. Marcadores con p-values menores que α^* se declaran significativos.

3.8.4 Test de desequilibrio de ligamiento

Debido a la gran fuente de variación que ofrecen los SNPs, el concepto de Haplotipo como combinación de alelos en diferentes marcadores a lo largo del mismo cromosoma desempeña un papel crucial en muchos estudios de variaciones en la expresión génica y la predicción de enfermedades. Basados en el desequilibrio de ligamiento (LD) o asociación alélica en donde grupos de SNPs pueden ser correlacionados entre sí. Los SNPs dentro de un bloque de haplotípico y en menor medida, los SNPs entre bloques haplotípicos cercanos tienden a permanecer correlacionados con el tiempo. El grado de correlación o LD se puede cuantificar de

dos maneras diferentes, los valores calculados de D' y r^2 . D' mide la desviación de las frecuencias haplotípicas de equilibrio de ligamiento y r^2 es una medida de la correlación entre un par de variables, cuando este valor es igual a uno (máximo valor) (InternationalHapMapConsortium 2003; Musunuru and Kathiresan 2008). El análisis de LD se realizó con el programa Haploview al igual que la conformación de haplotipos entre las variables.

3.8.5 Análisis de correspondencia múltiple (ACM) y multifactor dimensionality reduction (MDR)

El análisis de correspondencia múltiple es una técnica estadística para análisis de tablas de contingencia y construye un diagrama basado en la asociación, se basa en la búsqueda de aquellas variables o factores “cercanas” (altamente correlacionadas) a todos los grupos, en este caso, genética y ambiente con el diagnóstico de EA y un grupo control. En el gráfico se representan la proximidad entre los puntos, indicando un nivel de asociación entre dichos factores. Este análisis se realizó con el software R (<http://www.r-project.org/>).

En el caso de análisis mediante MDR, este es un método no paramétrico y que no asume ningún modelo genético en particular, permitiendo establecer la posible interacción entre diferentes variables principalmente genéticas (epistasis), sin embargo, pero puede ser usado para evaluar posibles interacciones gen- ambiente. Este método realiza inicialmente una validación cruzada (cross-validation) que sirve para evaluar los resultados del análisis estadístico y garantizar que son independientes de la partición entre datos de entrenamiento y prueba. En este paso los datos se dividen en un set de entrenamiento (9/10 de los datos) y un set de prueba (1/10); de aquí in pool de factores genéticos y ambientales son seleccionados, estos factores son representados en unas celdas y se determinan como alto riesgo si el ratio entre los afectados y los no afectados excede el threshold T ($T=1$) o de bajo riesgo si no lo excede; de aquí se evalúa el mejor modelo de clasificación para casos y controles. (Ritchie, Hahn et al. 2001; Hahn, Ritchie et al. 2003). Estos análisis se realizaron con el software MDR(<http://sourceforge.net/projects/mdr/>).

Capítulo IV. Resultados

4.1 Población de estudio

La muestra evaluada en este estudio fueron 114 pacientes con LOAD (edad media de 73,90 años) y 114 controles (edad media de 73,79 años); además se analizaron 30 pacientes con EAOD (edad media 58,69 años) y sus controles (edad media 58,63 años); los pacientes y controles en ambos grupos fueron pareados por edad (± 4 años) y género. Aproximadamente el 76% de los sujetos en LOAD fueron mujeres y el 80% en EAOD fueron mujeres. El porcentaje de casos que presentaron alelo 4 en LOAD fue 58,00% Vs 13,00% en sus controles y en EAOD los pacientes portadores de al menos un alelo 4 fue 56,66% Vs un 18,51% en sus controles (Tabla 3)

Tabla 3. Características de los pacientes con LOAD y EAOD y sus controles.

	LOAD	CONTROLES (LOAD)	EAOD	CONTROLES (EAOD)
Numero personas	114	114	30	30
Edad (Años)	73,90	73,79	58,60	58,63
Hombre: Mujer	24,56%:75,43%		20%:80%	
Estado civil				
Casado	46,42 %	47,82 %	34,48 %	50 %
Soltero	1,78 %	14,49 %	13,79 %	15 %
Viudo	44,64 %	30,43 %	27,58 %	15 %
Separado	4,46 %	7,24 %	17,24 %	15 %
U. libre	2,67 %	0 %	6,89 %	5 %
Nivel educativo				
SI	7,14 %	6,45 %	3,33 %	0 %
PC	21,42 %	25,80 %	26,66 %	15,38 %
PI	16,07 %	24,73 %	23,33 %	3,84 %
BC	15,17 %	9,67 %	6,66 %	23,07 %
BI	21,42 %	15,05 %	30,00 %	11,53 %
SU	18,75 %	18,27 %	10,00 %	46,15 %
Lugar de origen				
Antioquia	2,70 %	4,21 %	0,00 %	3,84 %
Bogotá D.C	27,02 %	22,10 %	34,48 %	38,46 %
Boyacá	10,81 %	28,42 %	17,24 %	23,07 %
Cundinamarca	27,02 %	30,52 %	13,79 %	11,53 %
Tolima	9,90 %	5,26 %	13,79 %	11,53 %
Otros	22,52 %	9,47 %	20,68 %	11,53 %
APOE $\epsilon 4$ (+) Vs $\epsilon 4$ (-)	58,00 % Vs 42,50 %	13,00% Vs 86,80 %	56,66% Vs 43,30%	18,51 % Vs 81,50 %

SI: Sin instrucción, PC: Primaria completa, PI: Primaria incompleta, BC: Bachillerato completo, BI: Bachillerato incompleto, SU: Superior.

Además se revisaron factores como el nivel educativo, la escolaridad y el departamento de procedencia de los casos y los controles. El estado civil casado fue el más predominante en LOAD (46,42 %) y EAOD (34,48%), seguido por el estado Viudo con 44,64 % y 27,58 % para LOAD y EAOD, respectivamente. En los controles LOAD el más predominante fue el estar casado (47,82 %), seguido de viudo (30,43 %) y soltero (14,49 %). En cuanto al nivel educativo el más predominante en LOAD fue primaria completa y bachillerato incompleto con el mismo porcentaje (21,42%) y la primaria incompleta y el bachillerato completo también tienen un porcentaje importante 16,07 % y 15,17 %, respectivamente. Para EAOD el comportamiento fue similar a LOAD con un predominio de la primaria completa (26,66 %) y el bachillerato incompleto (30,00 %); el menor porcentaje lo tiene sin instrucción en los dos tipos de EA.

En el caso de lugar de procedencia Bogotá D.C y los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Tolima presentan los mayores porcentajes entre los grupos, esto se debe a que los pacientes aquí analizados son los que se evalúan en las instalaciones del Instituto de Genética de la Universidad Nacional - Sede Bogotá (IGUN) y por facilidades de transporte y cercanía al lugar acuden a consulta con este grupo. Para realizar una correlación entre demencia y el lugar de procedencia sería necesario realizar un estudio poblacional en el territorio Colombiano.

4.2 Genotipificación con la metodología SNaPshot

En este trabajo se estandarizó la técnica ABI PRISM® SNaPshot® Multiplex Kit (Applied Biosystems) que permitió la detección de 10 polimorfismos de nucleótidos simple (SNPs) en 8 genes para buscar asociación de estos con la EA en Colombia. Los SNPs estudiados fueron CLU(rs11136000), PICALM(rs3851179), BIN1(rs744373), TOMM40(rs2075650), PVRL2(rs6859), APOE(rs440446), SORL1(rs11218304), CR1(rs381861) y GWA_14q32.13(rs11622883).

Para la estandarización de la técnica SNaPshot, se realizó inicialmente la prueba con el kit de SNaPshot primer focus, esto con el fin de determinar cuál era la posición en el electroferograma y las características que debe tener cada pico para que pueda ser detectado como un alelo por el programa GeneMapper 2.0 (Anexo IX)

Posteriormente, debido a que cada uno de los 10 SNPs funcionan a una concentración diferente del primer de SNaPshot, se realizaron mezclas a distintas concentraciones de pool de primers de los 10 SNPs usando inicialmente una concentración 0.2 μ M, a partir de esta concentración inicial se realizaron modificaciones de la concentración de cada primer, logrando así que su visualización fuera homogénea y el programa GeneMapper detectara sin inconvenientes los diferentes genotipos obtenidos para cada individuo (Figura 2, Anexo II).

Finalmente, se logró evidenciar el genotipo de los 10 SNPs en los pacientes con EA y sus controles; cada genotipo fue sometido a una revisión manual en donde se confirmaba que el programa reconociera el pico adecuado para cada alelo de cada uno de los SNPs (Figura 3) y seguidamente todos los resultados fueron exportados en una tabla para su análisis.

Figura 2. Electroferograma de los 10 SNPs utilizando la técnica SNaPshot.

Electroforesis capilar de los productos de SNaPshot de un sujeto corridos en el analizador genético ABI 3500 y visualizados en el software GeneMapper 3.0. Para cada SNP se muestra el panel de reconocimiento de cada alelo y la correspondiente altura de los picos.

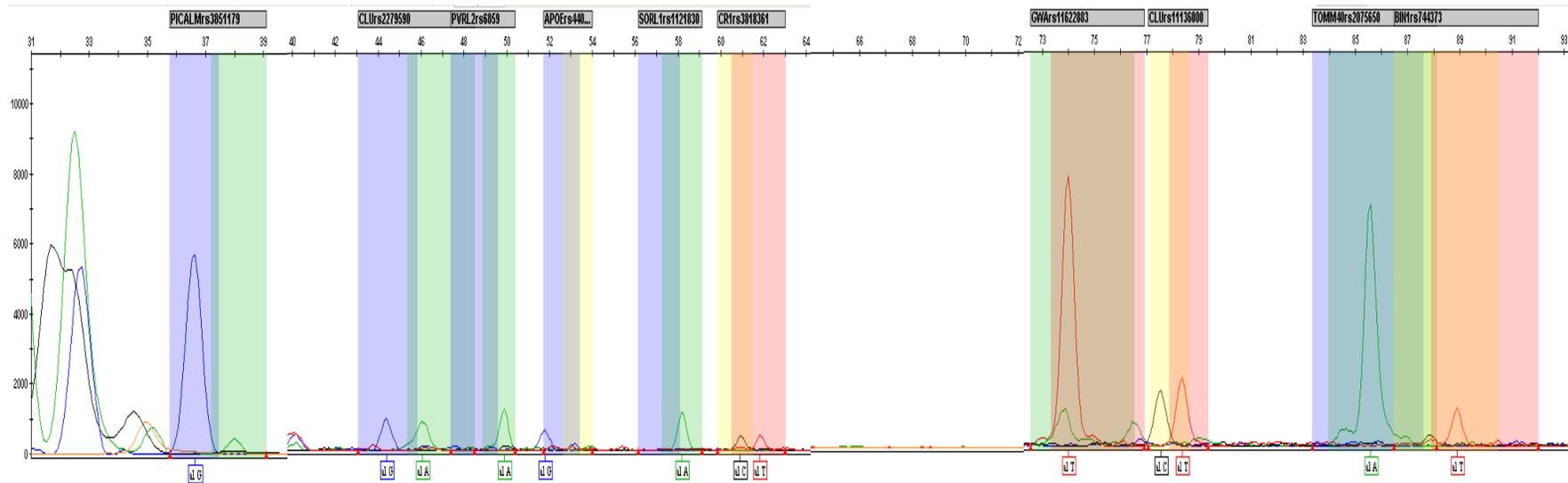
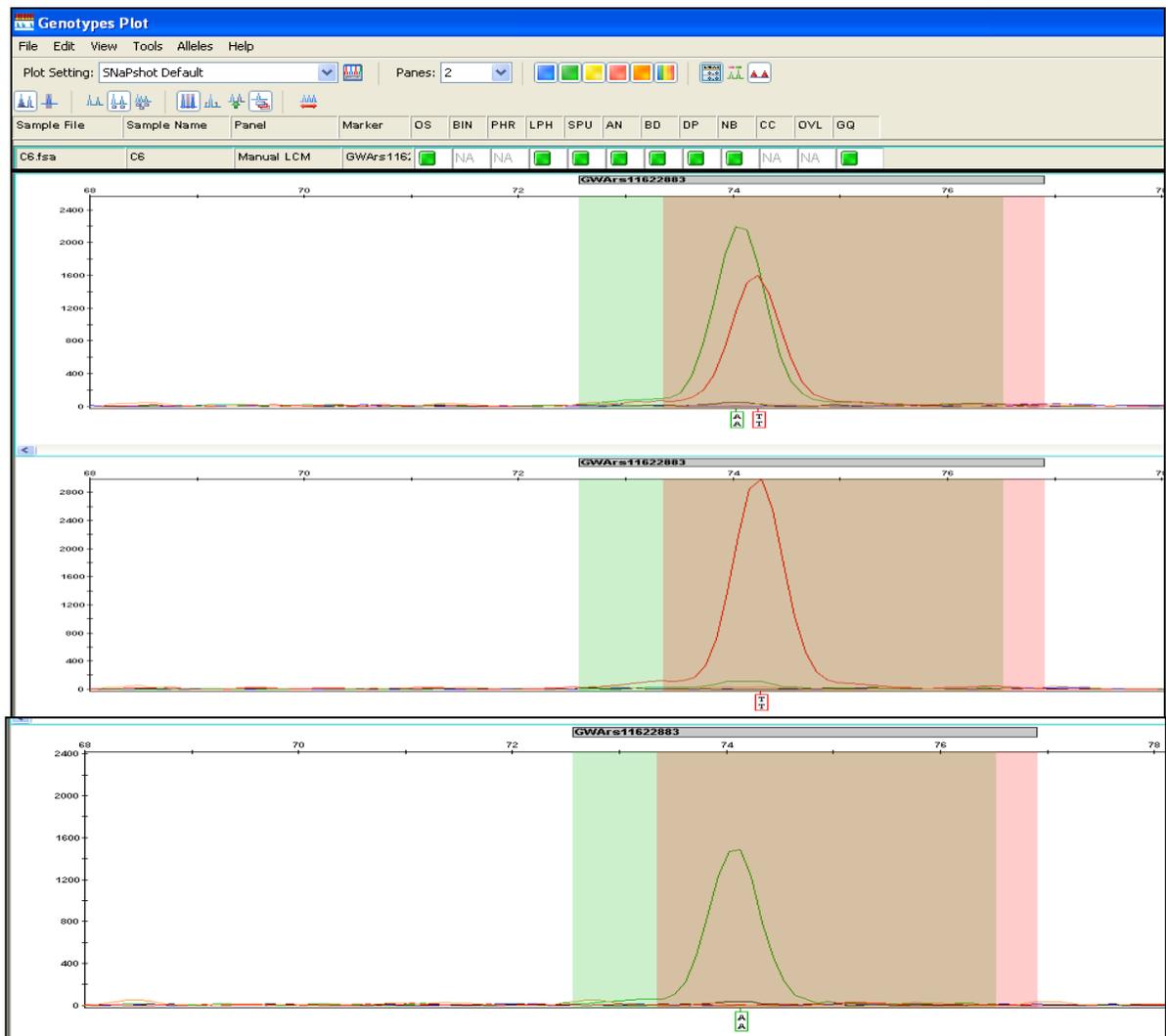


Figura 3. Ampliación del SNP GWA_14q32.13 (rs11622883) detectado con el método de SNaPshot. Electroforesis capilar del producto de SNaPshot de un sujeto corrido con un analizador genético ABI 3500 y visualizado en el software GeneMapper 3. El pico en verde denota el alelo A y el rojo el alelo T. Se muestra los genotipos A/T, T/T y A/A.



4.3 Distribución de los alelos de los 10 SNPs en pacientes con LOAD y EAOD

Un total de 10 SNPs fueron genotipificados para los pacientes LOAD y EAOD y sus controles, los polimorfismos incluyen los genes TOMM40, GWA_14q32.13, BIN1, CLU, CR1, PICALM, PVRL2, SORL1 y APOE. Los SNPs CLURs2279590, TOMM40rs2075650 y PICALMrs3851179 no se encontraban en equilibrio de Hardy weinberg (HW $p < 0.001$) (Clarke, Anderson et al. 2011) en pacientes con LOAD y EAOD todos los SNPs se encontraban en equilibrio de HW (Anexo X).

Las tablas 4 y 5 muestran la distribución de los alelos y los genotipos de los 10 SNPs, respectivamente. Se evidencia alguna diferencia de distribución de alelos en los casos con EA y sus controles. Más adelante se mostrará el análisis de asociación basado en estas diferencias alélicas y genotípicas, estas tablas de distribución es un conteo inicial de los alelos y genotipos encontrados, pero con una estimación de chi- cuadrado y una estimación de ORs se evidenciará la posible asociación con la EA.

Adicionalmente, ya que no se cuentan con estudios poblacionales Colombianos para los marcadores aquí estudiados, una aproximación del comportamiento de las frecuencias alélicas y genotípicas en nuestra población es el análisis de una sub-muestra de controles para pacientes con EA, cabe recordar que estos controles no presentan antecedentes de demencia y son acompañantes de estos pacientes a la consulta en el IGUN. De manera que se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas en una muestra que incluye 180 individuos control con cuatro de las poblaciones reportadas en la base de datos de HapMap; estas poblaciones de comparación fueron: ASW (African ancestry in Southwest USA), TSI (Tuscan in Italy), CEU (Utah residents with Northern and Western European ancestry) y MEX (Mexican ancestry in Los Angeles, California) (Tabla 6). Se encontraron similitudes y diferencias entre las frecuencias reportadas en este estudio y las otras poblaciones, muchas de estas frecuencias son concordantes con CEU y MEX, sin embargo otras no y por el contrario son mas concordantes con ASW y TSI; estas diferencias en las frecuencias podría deberse a las diferencias en el origen ancestral del grupo aquí escogido para la comparación.

Tabla 4. Distribución de los alelos de los 10 SNPs evaluados en pacientes LOAD y EOAD y sus controles.

SNP	LOAD N° (%)	CONTROL N° (%)	EAOD N° (%)	CONTROL N° (%)
TOMM40rs2075650				
G	68 (31.77)	25 (11.68)	22 (29.28)	7 (12.50)
A	146 (68.22)	189 (88.31)	34 (60.71)	49 (87.50)
GWArS11622883				
A	82 (36.60)	46 (20.17)	27 (45.00)	20 (35.71)
T	142 (63.39)	182 (79.82)	33 (55.00)	36 (64.28)
BIN1rs744373				
C	54 (28.72)	39 (20.96)	13 (28.26)	15 (31.25)
T	134 (71.27)	147 (79.03)	33 (71.73)	33 (68.75)
CLUrs2279590				
A	86 (40.56)	72 (33.64)	25 (43.10)	26 (48.14)
G	126 (59.43)	142 (66.35)	33 (56.89)	28 (51.85)
CR1rs3818361				
T	35 (17.67)	29 (13.42)	9 (16.66)	4 (8.00)
C	163 (82.32)	187 (86.57)	45 (83.33)	46 (92.00)
APOErS440446				
C	53 (30.11)	64 (34.04)	12 (23.07)	16 (32.00)
G	123 (69.88)	124 (65.95)	40 (76.92)	34 (68.00)
CLUrs11136000				
T	78 (36.11)	80 (35.71)	23 (39.65)	16 (27.58)
C	138 (63.88)	144 (64.28)	35 (60.34)	42 (72.41)
PICALMrS3851179				
A	83 (37.72)	87 (39.18)	17 (31.48)	29 (48.33)
G	137 (62.27)	135 (60.81)	37 (68.51)	31 (51.66)
SORL1rs1121830				
G	52 (24.52)	53 (23.66)	14 (23.33)	12 (22.22)
A	160 (75.47)	171 (76.33)	46 (76.66)	42 (77.77)
PVRL2rs6859				
A	68 (34.00)	69 (32.24)	27 (54.00)	19 (38.00)
G	132 (66.00)	145 (67.75)	23 (46.00)	31 (61.00)

Tabla 5. Distribución de genotipos de los 10 SNPs evaluados en pacientes con LOAD y EAOD sus controles.

GENOTIPO	LOAD N° (%)	CONTROLES N° (%)	EAOD N° (%)	CONTROLES N° (%)
TOMM40rs2075650				
AA	53 (49.53)	88 (82.24)	13 (46.42)	22 (78.57)
AG	40 (37.38)	13(12.14)	8 (28.57)	5 (17.85)
GG	14 (13.08)	6 (5.60)	7 (25.00)	1 (3.57)
GWArsl1622883				
TT	44 (49.28)	73 (64.03)	7 (23.33)	11 (39.28)
AT	54 (48.21)	36 (31.57)	19 (63.33)	14 (50.00)
AA	14 (12.50)	5 (4.38)	4 (13.33)	3 (10.71)
BINrs744373				
TT	51 (54.25)	63 (58.33)	13 (56.52)	14 (58.33)
CT	32 (34.04)	21 (22.58)	7 (30.43)	5 (20.83)
CC	11 (11.70)	9 (9.67)	3 (13.04)	5 (20.83)
CLUrs2279590				
GG	45 (42.45)	55 (51.40)	10 (34.48)	8 (29.62)
AG	36 (33.96)	32 (29.90)	13 (44.82)	12 (44.44)
AA	25 (23.58)	20 (18.69)	6 (20.68)	7 (25.92)
CRrs3818361				
TT	5 (5.05)	0 (0.00)	2 (7.40)	0
CT	25 (25.25)	29 (26.85)	5 (18.51)	4 (16.00)
CC	69 (69.69)	79 (73.14)	20 (74.07)	21 (84.00)
APOErs440446				
CC	10 (11.36)	11 (11.70)	4 (15.38)	3 (12.00)
CG	33 (37.5)	42 (44.68)	4 (15.38)	10 (40.00)
GG	45 (51.13)	41 (43.61)	18 (69.23)	12 (48.00)
CLUrs11136000				
TT	12 (11.11)	6 (5.35)	5 (17.24)	0
CT	54 (50.00)	68 (60.71)	13 (44.82)	16 (55.17)
CC	42 (38.88)	38 (33.92)	11 (37.93)	13 (44.82)
PICALMrs3851179				
GG	34 (30.90)	28 (25.22)	11 (40.74)	5 (16.66)
AG	69 (62.72)	79 (71.17)	15 (55.55)	21 (70.00)
AA	7 (6.36)	4 (3.60)	1 (3.70)	4 (13.33)
SORLrs1121830				
GG	10 (9.43)	6 (5.35)	1 (3.33)	1 (3.70)
AG	32 (30.18)	41 (36.60)	12 (40.00)	10 (37.03)
AA	64 (60.37)	65 (58.03)	17 (56.66)	16 (59.25)
PVRL2rs6859				
AA	8 (8.00)	13 (12.14)	10 (40.00)	2 (8.00)
AG	52 (52.00)	43 (40.18)	7 (28.00)	15 (60.00)
GG	40 (40.00)	51 (47.66)	8 (32.00)	8 (32.00)

Tabla 6. Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas en 180 controles con población ASW, TSI, CEU y MEX.

	COL	ASW	TSI	CEU	MEX
TOMM40rs2075650					
A/A	0.834	0.736	0.818	0.717	0.776
A/G	0.124	0.226	0.170	0.248	0.224
G/G	0.041	0.038	0.011	0.035	0
A	0.896	0.849	0.903	0.841	0.888
G	0.103	0.151	0.097	0.159	0.112
GWArS11622883					
A/A	0.056	0.043	NR	0.167	NR
A/T	0.380	0.217		0.333	
T/T	0.562	0.739		0.500	
A	0.247	0.152		0.333	
T	0.752	0.848		0.667	
BIN1rs744373					
TT	0.673	0.268	0.535	0.487	0.397
CT	0.215	0.536	0.376	0.398	0.466
CC	0.111	0.196	0.089	0.115	0.138
C	0.218	0.464	0.277	0.314	0.371
T	0.781	0.536	0.723	0.686	0.629
CLUrs2279590					
GG	0.470	NR	NR	0.458	NR
AG	0.327			0.458	
AA	0.202			0.085	
A	0.366			0.314	
G	0.633			0.686	
CR1rs3818361					
TT	0	0.175	0.039	0.097	0
CT	0.271	0.544	0.333	0.319	0.241
CC	0.728	0.281	0.627	0.584	0.759
C	0.864	0.553	0.794	0.743	0.879
T	0.135	0.447	0.206	0.257	0.121
APOErS440446					
CC	0.114	NR	NR	NR	0.130*
CG	0.422				0.478
GG	0.463				0.392
C	0.325			0.375	0.370
G	0.674			0.625	0.630
CLUrs11136000					
TT	0.057	0.333	0.157	0.106	0.190
CT	0.591	0.509	0.490	0.487	0.328
CC	0.350	0.158	0.353	0.407	0.483
C	0.646	0.412	0.598	0.650	0.647
T	0.354	0.588	0.402	0.350	0.353
PICALMrs3851179					
GG	0.232	0.750	0.422	0.354	0.379
AG	0.710	0.250	0.412	0.469	0.362
AA	0.056	0	0.167	0.177	0.259
A	0.419	0.125	0.373	0.412	0.440
G	0.588	0.875	0.627	0.588	0.560
SORL1rs11218304					
GG	0.057	NR	NR	NR	NR

AG	0.385				
AA	0.557				
A	0.750	0.850		0.873	
G	0.250	0.150		0.127	
PVRL2rs6859					
AA	0.102	0.211	0.186	0.195	0.052
AG	0.427	0.474	0.520	0.496	0.500
GG	0.469	0.316	0.294	0.310	0.448
A	0.316	0.447	0.446	0.442	0.302
G	0.683	0.553	0.554	0.558	0.698

ASW: (African ancestry in Southwest USA), **TSI:** (Tuscan in Italy), **CEU :** Utah residents with Northern and Western European ancestry; **MEX :** Mexican ancestry in Los Angeles, California. **NR:** No reportes en HapMap. *Población Hispana.

Además de estos 10 SNPs se realizó la genotipificación para los alelos e2, e3 y e4 de APOE por la metodología de RFLPs (Tabla 7). Los resultados indican que hay una diferencia en la distribución de los alelos de APOE entre los grupos. El grupo de pacientes LOAD y sus controles presentan una diferencia en la distribución del alelo APOEe4 estadísticamente significativa (LOAD: 32.30% Vs Controles: 12.08%; $p < 0.0001$), de la misma manera estas diferencias se observan en el grupo EAOD (EAOD: 36.66% Vs controles: 9.25%; $p: 0.0007$). También se encontraron diferencias en las frecuencias de e3 en los grupos (LOAD: 63.71% Vs Controles: 81.31% $p: 0.0001$ y EAOD: 60.00% Vs Controles: 83.33% $p: 0.0073$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las frecuencias de e2.

En el grupo control para LOAD y EOAD no se encontraron individuos homocigotos para APOEe4 (LOAD: 7.07% y EAOD: 16.66%). El genotipo APOEe2/4 se encontró solamente en el grupo LOAD y un individuo control de este grupo. El genotipo APOE e2/2 no se encontró en el grupo LOAD y sus controles y solo fue encontrado en un individuo con EAOD.

Se analizó la asociación existente entre no tener ningún alelo APOEe4, al menos uno o tener ser homocigoto para este alelo (Tabla 8). Los resultados muestran como no tener ningún alelos APOEe4 resulta ser un factor protector para LOAD (OR: 0.11, CI: 0.054, 0.228; $p < 0.0001$), tener al menos una copia de APOE e4 también resulta ser un factor de riesgo para LOAD (OR: 6.70, CI: 3.292, 13.638; $p < 0.0001$) y ser homocigoto APOEe4/4 es el factor de riesgo más importante para LOAD (OR: 14.74, CI: 0.838, 259.16; $p: 0.0092$) y también para EAOD (OR: 11.86, CI: 0.623, 225.63; $p: 0.0533$).

Tabla 7. Distribución de alelos y genotipos entre pacientes LOAD, EAOD y sus controles discriminados por subgrupos.

GRUPO	N°	FRECUENCIAS ALÉLICAS					
		E2	E3	E4			
LOAD	113	9 (3.98%)	144 (63.71%)	73 (32.30%)			
CONTROLES	91	12 (6.59%)	148 (81.31%)	22 (12.08%)			
OR CI p-Value		0.58 (0.241, 1.427) 0.264	0.40 (0.254, 0.639) 0.0001	3.47 (2.051, 5.871) < 0.0001			
EAOD	30	2 (3.33%)	36 (60.00%)	22 (36.66%)			
CONTROLES	27	4 (7.40%)	45 (83.33%)	5 (9.25%)			
OR CI p-Value		0.42 (0.074, 2.406) 0.4168	0.30(0.124, 0.725) 0.0073	5.78 (2.008, 16.693) 0.0007			
GRUPO	N°	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS					
		22	23	24	33	34	44
LOAD	113	0 (0.0%)	1 (0.88%)	8 (7.07%)	47 (41.59%)	49 (43.36%)	8 (7.07%)
CONTROLES	91	0 (0.0%)	11(12.08%)	1 (1.09%)	68 (74.72%)	11 (12.08%)	0 (0.0%)
EAOD	30	1 (3.33%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	12 (40.00%)	12 (40.00%)	5 (16.66%)
CONTROLES	27	0 (0.0%)	4 (14.81%)	0 (0.0%)	18 (66.66%)	5 (18.51%)	0 (0.0%)

Tabla 8. Análisis de asociación para los portadores y no portadores de APOEε4.

GRUPO	NO 4	4/- y 44	4/-	4/4
	OR (CI) p - valor	OR (CI) p - valor	OR (CI) p - valor	OR (CI) p - valor
LOAD	0.11 (0.054, 0.228) < 0.0001	8.91 (4.371, 18.184) < 0.0001	6.70 (3.292, 13.638) < 0.0001	14.74 (0.838, 259.16) 0.0092
EAOD	0.17 (0.051, 0.583) 0.0059	5.75 (1.715 , 19.303) 0.0059	2.93 (0.870, 9.890) 0.0908	11.86 (0.623, 225.63) 0.0533

4.4 Asociación de los SNPs con la enfermedad de Alzheimer (LOAD y EOAD)

Se evaluó la asociación con la enfermedad de Alzheimer de los 10 SNPs y los alelos APOE e2, e3 y e4 en nuestra población; en 114 pacientes LOAD y 30 pacientes EOAD y sus controles. Como era de esperarse se encontró asociación entre el alelo e4 de APOE y la EA, como se mostró anteriormente. Además de la asociación con el alelo APOEe4 se encontró asociación con el polimorfismo TOMM40rs2075650 (OR: 3.869, CI: 2.12, 5.84; P: 4.656e-007) y GWArS11622883 (OR: 2.285, CI: 1.49, 3.48; P: 0.0001059) en LOAD; estas asociaciones pasaron la corrección de Bonferroni. Así mismo se muestra una tendencia de asociación sin ser estadísticamente significativa en los SNPs BIN1rs744373 (OR: 1.519, CI: 0.94, 2.49; P: 0.08274), CLUrS2279590 (OR: 1.346, CI: 0.90,1.99; P: 0.1392) y CR1rs3818361 (OR: 1.385, CI: 0.81, 2.36; P: 0.232);. No se encontró asociación con LOAD para los marcadores APOErS440446, CLUrS11136000, PICALMrS3851179, SORL1rs1121830 y PVRL2rs6859 (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de asociación entre los 10 SNPs y LOAD

Cromosoma	SNP	Alelo asociado	P-value NO ajustado	p-value Bonferroni	OR 95% CI
19	TOMM40rs2075650	G	4.656e-007	5.588e-006	3.521 (2.12,5.84)
14	GWArS11622883	A	0.0001059	0.00127	2.285 (1.49, 3.48)
2	BIN1rs744373	C	0.08274	0.9929	1.519 (0.94, 2.49)
8	CLUrS2279590	A	0.1392	1	1.346 (0.90,1.99)
1	CR1rs3818361	T	0.232	1	1.385 (0.81, 2.36)
19	APOErS440446	G	0.4225	1	0.8349 (0.53, 1.29)
8	CLUrS11136000	C	0.9309	1	1.017 (0.68,1.50)
11	PICALMrS3851179	A	0.7521	1	0.9401 (0.64,1.37)
10	SORL1rs11218304	G	0.8323	1	1.049 (0.67,1.62)
19	PVRL2rs6859	G	0.7042	1	1.083 (0.71, 1.63)

OR: Odds ratio, 95% CI: Intervalo de confianza

En el caso de pacientes EAOD además de la asociación con APOEε4 se encontró asociación con TOMM40rs2075650 (OR: 4.529, CI: 1.74, 11.79; P: 0.001214), en este caso no se encontró asociación significativa con GWArS11622883 (OR: 1.473, CI: 0.69, 3.10; P: 0.3087) como la que se muestra en pacientes LOAD. Además se encontró una tendencia de asociación pero no es estadísticamente significativa con CR1rs3818361 (OR: 2.3, CI:0.66,8.00; P: 0.1818), PVRL2rs6859 (OR:1.915, CI: 0.86,4.25; P: 0.1085) y CLUrS11136000 (OR:1.725, CI: 0.79,3.763; P: 0.1689). No se encontró asociación al desarrollo de EAOD con los SNPs SORL1rs11218304, BIN1rs744373, CLUrS2279590, APOErs440446 y PICALMrS3851179 (Tabla 10). Estos pacientes EOAD no tienen genotipificación para APP, PS1 y PS2 para saber si su presentación corresponde a variaciones de tipo determinístico.

Tabla 10. Análisis de asociación entre los 10 SNPs y EAOD

Cromosoma	SNP	Alelo asociado	P-value NO AJUSTADO	p-value Bonferroni	OR
19	TOMM40rs2075650	G	0.001214	0.01456	4.529 (1.74,11.79)
1	CR1rs3818361	T	0.1818	1	2.3 (0.66,8.00)
19	PVRL2rs6859	G	0.1085	1	1.915 (0.86,4.25)
8	CLUrS11136000	C	0.1689	1	1.725 (0.79,3.763)
14	GWArS11622883	A	0.3087	1	1.473 (0.69,3.10)
10	SORL1rs11218304	G	0.8877	1	1.065 (0.44,2.56)
2	BIN1rs744373	C	0.7514	1	0.866 (0.35,2.10)
8	CLUrS2279590	A	0.5922	1	0.815 (0.38,1.71)
19	APOErs440446	G	0.3127	1	0.637 (0.26,1.53)
11	PICALMrS3851179	A	0.06707	0.8048	0.491 (0.22,1.05)

OR: Odds ratio, 95% CI: Intervalo de confianza

Los ORs presentados aquí fueron comparados con los reportes de los metanálisis consignados en la base de datos Alzgene (<http://www.alzgene.org/>), estos son reportes tanto de GWAS como de estudios caso-control en otras poblaciones. La Tabla 11 muestra estas comparaciones y se evidencia una diferencia entre los ORs de los SNPs de este estudio y los otros. Aunque existen diferencias en algunos de los reportes, se presentan concordancias con la población caucásica y española. Estas diferencias quizás se deban a diferencias en el origen ancestral de los individuos evaluados, el tipo de análisis, los criterios de inclusión y exclusión de los individuos, la metodología usada en cada estudio, entre otras variables que pueden afectar de manera diferencial los resultados de los estudios de asociación genética.

Tabla 11. Comparación de los ORs de los SNPs con otros estudios en EA.

SNP	ESTUDIO	POBLACIÓN	OR 95% CI	Poblacion colombiana*
TOMM40rs2075650	Harold, 2009	Alemana (C) UK (C) USA (C)	2.31 (1.91,2.78) 2.48 (2.27,2.70) 2.68 (2.36,3.03)	3.521 (2.12,5.84)
	Carrasquillo ,2009	Caucasico	2.93 (2.51,4.41)	
GWArS11622883	Grupe,2007	UK (C) USA (C)	0.86 (0.69,1.06) 1.00 (0.78,1.27)	2.285 (1.49, 3.48)
BIN1rs744373	Naj, 2011 Hollingworth, 2011 Hu,2011 Seshadri,2010 Lambet,2011	USA (C)	1.14 (1.06,1.23)	1.519 (0.94, 2.49)
		GERAD	1.15 (1.06,1,24)	
		USA (C)	1.16 (0.99,1.36)	
		Española (C)	1.17 (1.03,1.33)	
		Española (C)	1.43 (1.22,1.68)	
CLUrs2279590	YU,2010 Lambert,2009	Asiática (A)	0.81 (0.62,1.08)	1.346 (0.90,1.99)
		Bélgica	0.82 (0.70,0.96)	
		Finlandia	0.92 (0.78,1.08)	
		Francia	0.83 (0.77, 0.89)	
		Italia	0.87 (0.78,0.98)	
		España	0.91 (0.79,1.06)	
CR1rs3818361	Naj,2011 Hollingworth, 2011 Hu,2011 Jun,2010	USA (C)	1.13 (1.04,1.23)	1.385 (0.81, 2.36)
			1.16 (1.07,1.25)	
		USA(C)	1.14 (0.96,1.11)	
		USA (D)	0.94 (0.79,1.11)	
		USA (H)	1.00 (0.82,1.24)	
	Israel (C)	1.14 (0.71,1.81)		
	Zhang,2010	Africana	1.24 (0.98,1.58)	
APOErs440446	YU, 2007 Nicodemus,2004 Bullido,2000 Lambert,1998 Mui,1996	C	0.54 (0.40, 073)	0.8349 (0.53, 1.29)
		C	0.55 (0.44,0.69)	
		C	0.48 (0.34,0.66)	
		C	0.61 (0.48,0.78)	
		C	0.61 (0.48,0.78)	

Capítulo IV. Resultados

		O	0.77 (0.51,1.14)	
CLUrs11136000	Hu,2011 Jun,2010 Yu,2010 Kamboh,2010 Seshadri,2010 Lambert,2009 Harold,2009	USA(C) USA(D) USA(C) USA(H) Israel (C) A C España (C) Europa (C) Bélgica (C) Finlandia (C) Francia (C) Italia (C) España (C) Alemania (C) UK (C) USA (C) C	0.87 (0.76,1.01) 1.06 (0.86,1.28) 0.91 (0.85,0.96) 1.10 (0.91,1.32) 0.96 (0.69,1.32) 0.83 (0.64,1.10) 0.94 (0.84,1.05) 0.88 (0.78,0.99) 0.90 (0.83,0.97) 0.89 (0.76,1.04) 0.88 (0.75,1.03) 0.83 (0.77,0.89) 0.88 (0.79,0.99) 0.93 (0.81,1.08) 0.76 (0.65,0.89) 0.86 (0.80,0.92) 0.86 (0.77,0.95) 0.99 (0.69,1.41)	1.017 (0.68,1.50)
PICALMrs3851179	Hu,2011 Jun,2010 Kamboh,2010 Carrasquillo,2010 Seshadri,2010 Lambert,2009 Harold,2009	C USA (C) USA (D) USA (C) USA (H) Israel (C) C C España (C) Europa (C) C Alemania (C) USA (C) UK (C)	0.90 (0.78,1.05) 0.83 (0.72,0.97) 0.84 (0.65,1.09) 0.89 (0.84,0.94) 1.10 (0.91,1.32) 0.98 (0.69,1.40) 0.90 (0.80,1.00) 0.84 (0.77,0.92) 0.83 (0.74,0.94) 0.90 (0.83,0.97) 0.94 (0.87,1.02) 0.91 (0.77,1.06) 0.88 (0.79,0.97) 0.82 (0.76,0.88)	0.9401 (0.64,1.37)
SORL1rs11218304	Cellini,2009 Bettens,2008 Lee,2007 Rogaeva,2007	C C USA (C) USA (D) USA (H) O Europa (C) USA (C)	1.24 (0.98,1.58) 1.08 (0.91,1.28) 1.10 (0.59,2.04) 0.80 (0.50,1.28) 1.14 (0.82,1.59) 1.94 (1.29,2.93) 1.38 (1.00,1.91) 1.09 (0.91,1.26)	1.049 (0.67,1.62)
PVRL2rs6859	Harol,2009 Carrasquillo,2009 Yu,2007	Alemania (C) UK (C) USA (C) C C	1.32 (1.13,1.55) 1.51 (1.40,1.62) 1.38 (1.24,1.53) 1.63 (1.46,1.82) 1.43 (1.08,1.89)	1.083 (0.71, 1.63)

*Reportado en este estudio. C. Caucásico; D: Descendencia africana; H: Hispanos; O: Mezcla /otros

4.5 Análisis de desequilibrio de ligamiento entre los marcadores

Los haplotipos son entendidos como una combinación de un set de alelos que se encuentra en sitios cercanos dentro del cromosoma, es decir que se encuentran en desequilibrio de ligamiento (LD), heredándose juntos con más frecuencia de lo esperado por el azar.

De los 12 SNPs seleccionados (incluyendo a los dos que conforman APOEe2, e3 y e4), se muestra cuadros rojos entre los SNPs del gen CLU (rs2279590 y rs11136000 y entre TOMM40, APOErs440446 y APOE rs429358, lo que podría indicar LD entre estos marcadores, el LD se determinó en el programa haploview por el algoritmo de Gabriel et al (Gabriel SB 2002) (Figura 4).

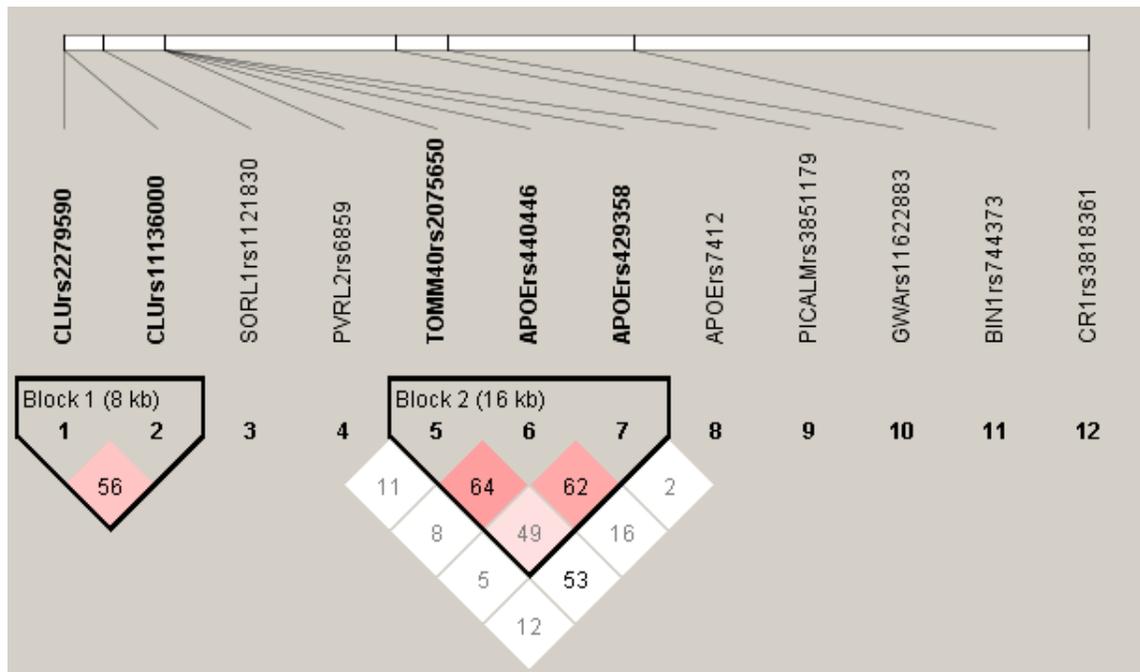
La historia de recombinación entre dos SNPs puede ser estimada con el uso de la medida de D' . Se define un fuerte LD entre dos marcadores si el valor es superior a 0.7 y bajo si está por debajo de 0.7. Para el coeficiente de correlación (r^2) que también es una medida dada en este tipo de análisis se estima que un r^2 mayor a 0.5 supone que los dos marcadores están fuertemente correlacionados. Es probable que las diferencias en LD con los reportes en otros estudios sean diferentes, pero esto podría atribuirse a las diferencias étnicas y demográficas de cada población.

Aunque no se conformaron bloques haplotípicos por default en Haploview ya que el D' no fue superior a 0.7, r^2 no fue mayor a 0.5 y la frecuencia no fue superior 0.5 para cada haplotipo y los marcadores dentro de los cromosomas son pocos, se puede conformaron haplotipos entre los marcadores como se muestra en la figura 4. Los haplotipos conformados por las variantes en CLU no presentaron asociación con la EA. Sin embargo los haplotipos conformados por TOMM40 y APOE indican que el haplotipo GGC incrementa el riesgo para los individuos (OR: 9,063; CI: 3.775, 21.759; p- valor: 1,42E-04 y el haplotipo GCC que contiene los alelos de riesgo para TOMM40 y APOEe4 (rs429358) también incrementa el riesgo (OR: 4,146; CI: 0.4596, 37.415; p-valor: 0.3552); esto podría indicar un efecto sinérgico entre estos SNPs para conferir riesgo a EA. El haplotipo AGT resulta protector (OR: 0,482; CI: 0.3294, 0.7071; p-valor: 2.0E-4) (Tabla 12).

Figura 4. Bloques Haplóticos de los SNPs realizados con Haploview para pacientes con LOAD.

A. Grafico de disequilibrio de ligamiento (LD) de los SNPs estudiados. El grafico LD muestra disequilibrio de ligamiento entre los SNPs CLUrs2279590 y CLUrs11136000, además entre TOMM40rs2075650, APOErs440446 y APOE rs429358 que define en alelo e4. Los números dentro de los cuadros rojos representan D' entre los SNPs, donde los números más altos representan mayor LD. En negrilla se muestran los bloques haplotípicos conformados. **B.** Haplotipos conformados en cada bloque presentado en el grafico LD y sus frecuencias.

A.



B.

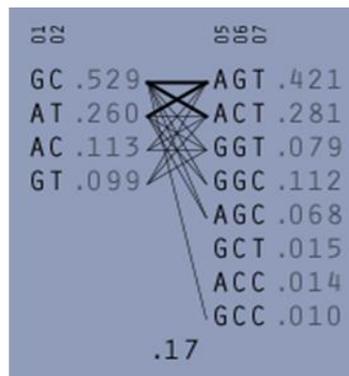


Tabla 12. Frecuencias y ORs de los haplotipos conformados entre los marcadores en el programa Haploview.

Haplotipo 1: CLUrs2279590 (alelos **G/A**) y CLUrs11136000 (alelos **C/T**); Haplotipo 2: TOMM40rs2075650 (alelos **A/G**), APOErs440446 (alelos **G/C**) y APOE rs429358 (alelos **T/C**). En negrilla los alelos de menos frecuencia para cada SNP.

BLOQUE	FRECUENCIA	OR 95% CI	P Value
Haplotipo 1			
GC	0.529	0,883 (0.6098, 1.281)	0.5776
AT	0.260	1,227 (0.8031, 1.875)	0.4013
AC	0.113	1,222 (0.6774, 2.205)	0.6051
GT	0.099	0,678 (0.3608, 1.277)	0.2942
Haplotipo 1			
AGT	0.421	0,482 (0.3294, 0.7071)	2.0E-4
ACT	0.281	0,674 (0.4455, 1.020)	0.0772
GGC	0.112	9,063 (3.775, 21.759)	1,42E-04
GGT	0.079	1,151 (0.5816, 2.277)	0.8183
AGC	0.068	1,935 (0.9045, 4.140)	0.1233
GCT	0.015	1,363 (0.3016, 6.167)	0.9810
ACC	0.014	2,569 (0.4930, 13.389)	0.4355
GCC	0.010	4,146 (0.4596, 37.415)	0.3552

Aunque la definición de Haplotipos asume que son combinaciones de alelos cercados en un Cromosoma y alto LD. Haploview permite realizar combinaciones entre marcadores, SNPs que están en cromosomas distintos en este caso, incluso entre los 10 SNPs evaluados aquí (Anexo XI). Se realizaron combinaciones de genotipos entre las variantes que presentaron riesgos por si solas como APOEe4, TOMM40 y GWA_14q32.13 con el fin de evaluar si alguna de estas combinaciones podrían presentar un riesgo mayor a desarrollar EA, específicamente LOAD (Tabla 13).

La combinación GCA que contiene los tres alelos de riesgo para confiere un riesgo incrementado (OR: 6.00, CI: 2.45, 14.70; p: 1.1274E-5), sin embargo, el hecho de tener solamente los alelos de riesgo para TOMM40 y APOE e4 (GCT) confiere un riesgo aun mayor (OR: 9.97, CI: 2.28, 43.51; p: 1.0E-4), esto parece indicar una interacción entre estos dos SNPs para producir EA. Aunque el LD no es muy alto como se vio anteriormente, se podría decir que son marcadores independientes pero pueden interactuar actuar como moduladores de la EA en la muestra analizada.

Tabla 13. Combinación de genotipos conformados por TOMM40, APOE e4 y GWA_14q32.13. La combinación de los tres alelos: a la derecha se encuentran los alelos de, TOMM40 en el medio los de APOEe4 y a la izquierda GWA_14q32.13. A, G y C son los alelos de riesgo para TOMM40, APOE e4 y GWA_14q32.13, respectivamente.

Combinación	Frecuencia Haplotipo	Frecuencia casos- controles	OR 95 % CI	p-Valor
ATT	0.543	0.401, 0.682	0.30 (0.20,0.45)	2.1502E-9
ATA	0.158	0.171, 0.146	1.22 (0.73,2.02)	0.4685
GCA	0.081	0.138, 0.025	6.00 (2.45,14.70)	1.1274E-5
ACT	0.071	0.092, 0.051	1.95 (0.91,4.17)	0.0902
GTT	0.060	0.062, 0.058	1.11 (0.51,2.42)	0.8827
GCT	0.044	0.081, 0.007	9.97(2.28,43.51)	1.0E-4
GTA	0.034	0.040, 0.028	1.56 (0.54,4.46)	0.4613

4.6 Asociación de de variables genéticas y ambientales con Diagnostico de Alzheimer

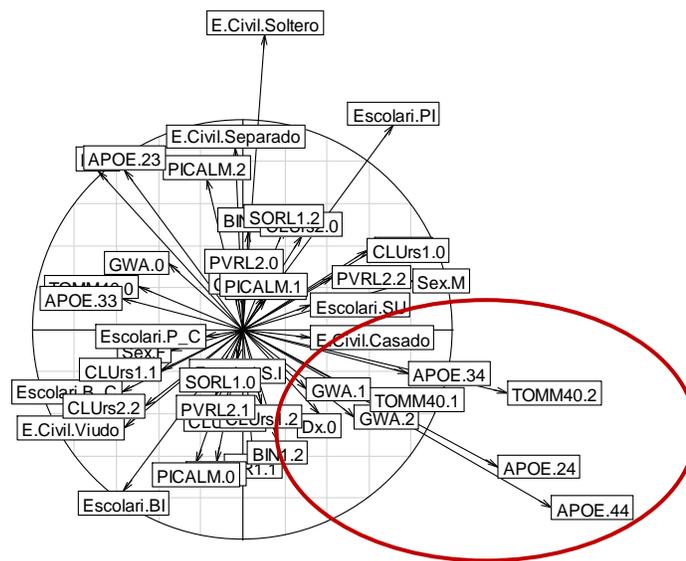
En la enfermedad de Alzheimer no solo factores genéticos sino también ambientales pueden contribuir a aumentar el riesgo de padecerla. Ya se mostraron como factores genéticos como APOEε4, TOMM40 y GWA_14q32 pueden contribuir al riesgo de desarrollar EA. Pero componentes de tipo ambiental pueden sumarse a estos factores genéticos e incrementar este riesgo; por esto que se evaluaron factores como el género, la escolaridad y el estado civil como posibles moduladores de la EA. Para esto, fueron analizados 234 individuos con diagnostico EA, algo más de la muestra analizada previamente, ya que para este análisis no se pareó por edad y genero, esto con el fin de establecer cuáles de estos factores estaban asociados al desarrollo de la enfermedad.

Un análisis por chi-cuadrado determinó que el género y el estado civil se encontraban asociados positivamente con el diagnostico EA o con el diagnostico sano. Se encontró que el género se encontraba asociado con un p-valor (0.00593) y el estado civil con un p-valor de (8.353e-05) siendo este el más significativo de las variables analizadas. Para saber qué estado civil está asociado a la EA, se ajustó un modelo log-lineal, donde se observa que el estado civil soltero está asociado positivamente con el diagnóstico Sano, mientras que las otras categorías de estado civil no parecen tener una influencia significativa en el diagnóstico.

Se realizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM) para evaluar relaciones entre las variables genéticas y ambientales con el diagnostico. Aquí fue necesario eliminar los individuos que tenían datos faltantes en al menos una variable, realizando este filtro, se tiene que un total de 168 individuos, de los cuales 110 tienen diagnóstico EA y 58 son controles. Fueron analizados 118 mujeres y 50 hombres, 90 personas están casadas y 12 solteras, 43 personas tienen nivel educativo superior y 8 sin instrucción (Anexo XII).

Se realizó el ACM y se evidencia la agrupación de las diferentes variables analizadas, este análisis presenta un grafico (Figura 5), se observa que el diagnostico de EA se agrupa según los individuos en el cuadrante de la esquina inferior derecha, en el caso de los controles no hay una clara distribución de las variables. Esto podría indicar que las variables evaluadas diferencian en parte pero no en la totalidad a los dos grupos (Anexo XIII).

Figura 5. Grafico de Análisis de correspondencia múltiple. Se muestra una representación grafica de la asociación entre variables. Las variables con baja participación con el diagnostico se muestran alejadas de las variables con mayor participación (Señaladas en el círculo rojo). En este caso las variables que más contribuyen al diagnostico serian APOE, TOMM40, GWA y estado civil.



En la figura se ven las contribuciones de los componentes genéticos y ambientales a los ejes factoriales. En esta figura se observa un eje factorial en donde se encuentra el diagnostico 0 (Pacientes) conformado principalmente por las variables APOEe44, APOEe24, APOEe34, TOMM40.2, TOMM40.1, GWAS.2; lo que indica que estas variables son las que contribuyen en mayor medida al desarrollo de la enfermedad. Este eje contrapone las categorías APOEe23, APOEe33, TOMM40.0, en donde se ven agrupados un número mayor de controles. Estos resultados indican que los genotipos en los polimorfismos en TOMM40 y APOE podrían ser importantes predictores para la EA.

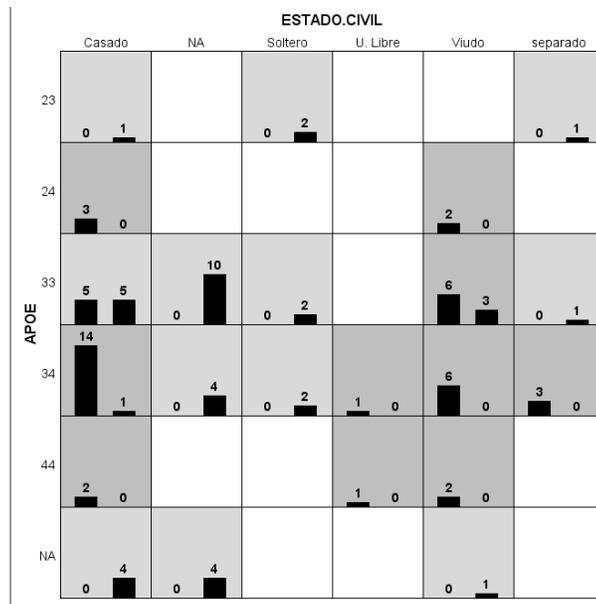
Otra herramienta utilizada aquí para evidenciar interacción entre factores tanto ambientales como genéticos fue el programa MDR (Multifactor Dimensionality Reduction), este método permite establecer la mejor interacción o el mejor modelo que muestre una contribución significativa con el diagnostico EA. Se realizó un análisis entre factores ambientales y genéticos, el cual permitió establecer que el mejor modelo de evaluación encontrada incluye las variables APOE y estado civil (Figura); aunque en el entrenamiento la precisión fue de 0.89 con una p-valor <

0.0001, la precisión en la prueba fue de 0.77 con una p-valor 0.1023. Otro modelo en este análisis se evidencia entre factores: Escolaridad, estado civil y APOE, este modelo tuvo una precisión en el entrenamiento de 0.94 con una p-valor < 0.0001 sin embargo tampoco se consideró significativo en la precisión de la prueba (0.69) con un p-valor de 0.24. Estos modelos permiten establecer reglas de asociación en donde la combinación de factores pueden hacer predicciones de diagnóstico, sugiriendo que factores como la Escolaridad, estados civil y APOE en conjunto podrían ser predictores del riesgo a EA pero tendría que ser validado con un mayor número de muestras.

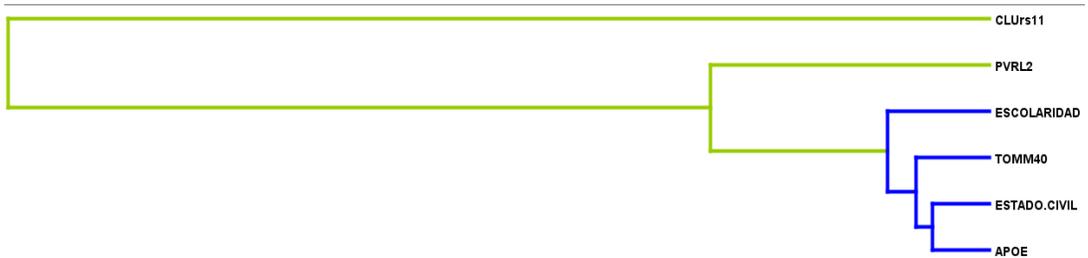
Otro tipo de análisis se realizó únicamente con las variables genéticas, como resultado se presenta un modelo de interacción entre TOMM40 y APOE (figura 6 y Anexo XIV), este modelo presenta en el entrenamiento una precisión de 0.84 con un p-valor < 0.0001, la precisión en la prueba fue de 0.78 con una p-valor 0.1006. Sin embargo, resulta una interacción significativa entre el genotipo mediante el análisis log-lineal entre GG de TOM40 y 44 de APOE (p-valor =0.0041) esto significa que estas variables no son independientes para conferir riesgo lo cual es soportado por el desequilibrio de ligamiento en el que se encuentran estos dos marcadores y el análisis de correspondencia múltiple que los agrupan en un solo eje.

Figura 6. Grafico de la distribución de variables de bajo riesgo y de alto riesgo para la EA. **A.** Las barras representan la distribución hipotética de casos (derecha) y controles (izquierda) con cada combinación entre APOE y estado civil. Las celdas oscuras representan la combinación de alto riesgo mientras que las celdas claras representan bajo riesgo. Las celdas blancas representan las combinaciones para las cuales no hay datos. **B.** Dendrograma de las la relación entre variables genéticas y ambientales. **C.** Dendrograma de las variables genéticas. B y C permite apreciar las relaciones de agrupación entre los datos.

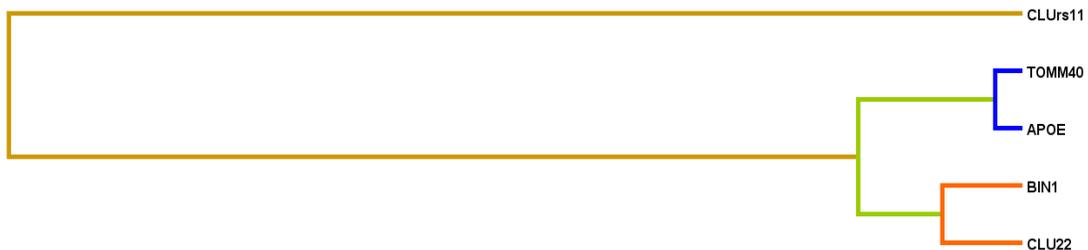
A.



B.



C.



Capitulo V. Discusión y conclusiones

5.1 Discusión

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en todo el mundo. Desde el punto de vista genético, la EA se distingue en dos formas, una de inicio temprano (EAOD) en donde los genes PS1, PS2 y APP (Suh YH 2002) son genes determinísticos en este tipo de EA; los casos EOAD corresponden a un pequeño porcentaje de los casos y ha sido estudiados en nuestro país, principalmente en población paisa (Lopera F 1997). La otra forma es la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (LOAD), en esta el único factor de riesgo genético hasta ahora establecido es APOEε4 (rs429358), esta ha sido ampliamente evaluado en diferentes poblaciones con resultados consistentes ya que confiere un riesgo de más de cuatro veces al desarrollo de la EA (Bettens K et al 2010). Sin embargo, este no se considera un factor ni necesario ni suficiente para desarrollar la enfermedad ya que una persona puede ser portador de APOEε4 y no desarrollar la EA o por el contrario podría ser no portadora de APOEε4 y desarrollar la patología.

El advenimiento de los estudios de genoma completo (GWAS) ha incrementado el número de genes asociados a LOAD, estos estudios han confirmado de manera significativa a APOEε4 como factor de riesgo al desarrollo de la EA. Los GWAS han abierto las posibilidades en estudios de asociación ya que a partir de la publicación del primero en 2007 se han realizado replicas que corroboran el riesgo que podrían generar genes como los evaluados en este estudio.

En Colombia además del reporte de asociación con APOEε4 (Arboleda, Yunis et al. 2001; Jacquier M 2001) no se cuentan con estudios caso-control que hayan encontrado significancia estadísticas con otras variantes potencialmente asociadas a LOAD. Por esta razón en el presente estudio con base en lo reportado en los GWAS se llevó a cabo un estudio de asociación caso-control que mediante la aplicación del método de SNaPshot para la evaluación en 114 pacientes LOAD, 30 pacientes EAOD y sus respectivos controles pareados por edad y género; se evaluaron las variantes CLURs11136000, PICALM rs3851179, CR1 rs6656401 y BIN1 rs744373, TOMM40 rs2075650, PVRL2 rs6859 y APOE rs440446, SORL1 rs11218304, CR1 rs381861 y GWA_14q32.13 rs11622883 en nuestra población.

De los anteriores marcadores no se tiene referencia alguna para población colombiana; un acercamiento a las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de ellos en nuestra población, es su determinación en una submuestra de 180 personas controles para EA. Se compararon estos individuos con las poblaciones

ASW, TSI, CEU y MEX reportadas en Hapmap (Tabla 6); estas comparaciones permiten establecer las diferencias entre nuestra población y las reportadas en el HapMap, las diferencias podrían estar basadas en el origen geográfico y ancestría de las poblaciones. Estos reportes de frecuencias alélicas y genotípicas del HapMap en diferentes áreas geográficas evidencia una selección positiva a favor de un alelo específico que quizás se deba a presiones selectivas específicas de cada región geográfica, esto resulta importante en términos de asociación de estas variantes con enfermedades multifactoriales como LOAD y pone en evidencia a estos loci como importantes en el estudio de vías de señalización y efectos a nivel funcional que confieran susceptibilidad de los individuos para entidades complejas como la EA. Otro punto tan importante son las diferencias en la arquitectura genética de los casos y controles, que podría afectar las asociaciones encontradas, esto se podría tener en cuenta en futuras investigaciones con un incremento además en el tamaño de la muestra (Wijsman, Pankratz et al. 2011).

Por otra parte, todos los marcadores en el grupo de pacientes EAOD se encontraban en equilibrio de Hardy Weinberg (HW); sin embargo para pacientes LOAD, los marcadores en CLU, PICALM y TOMM40 no se encontraron en HW (Anexo X). HW ha sido ampliamente usado para entender las características genéticas de las poblaciones; se asume que un alelo es dominante con respecto al otro, que los alelos no afectan a la fertilidad, que no existe migración de la población, que la población es grande y el apareamiento al azar (LiCC 1967; Wittke-Thompson, Pluzhnikov et al. 2005); una desviación del equilibrio HW (DHW) podría deberse a diferentes factores que hacen que fallen estas asunciones de HW.

Dentro de los factores que hay que tener en cuenta en estudios de asociación como el realizado aquí para evitar DHW es asegurar un apareamiento correcto en cuanto al background genético e influencia de factores ambientales entre el grupo de casos y controles; bajo algunas condiciones se esperaría una DHW debido a una heterogeneidad entre los grupos, para esto sería necesario asegurar que los grupos presenten similitudes en cuanto a su etnia, origen geográfico, además del apareamiento por edad y género que fue realizado en este estudio; las desviaciones presentadas pueden deberse a una combinación de factores que tendrían que ser evaluados en estudios posteriores.

Otros factores podrían favorecer sesgos en la muestra que conlleven a una DHW, uno de ellos es el tamaño de muestra usado y otro son los datos faltantes dentro de los individuos que conduzcan a una selección no aleatoria y a una desproporción de datos faltantes, por ejemplo una disminución de heterocigotos lo que conllevaría a un exceso de homocigotos en la muestra (Wittke-Thompson, Pluzhnikov et al. 2005). En el caso de los marcadores rs11136000 y rs2279590 en CLU se observa

DHW en los dos polimorfismos asociados, razón por la cual se podría asumir que esta DHW no se debe a errores de genotipificación ni a fallas en la aleatorización de los datos faltantes sino que se podría pensar en una falla en las asunciones de HW debido al LD que presentan estos dos marcadores.

En cuanto a la asociación, de manera consistente con los hallazgos previos de asociación de la EA con APOEε4 en población colombiana (Arboleda, Yunis et al. 2001; Jacquier M 2001), encontramos aquí una asociación significativa con APOEε4 indicando que este sigue considerándose el único factor de riesgo claramente establecido para distintas poblaciones incluyendo la nuestra. Se encontró una asociación significativa entre LOAD y las variaciones TOMM40rs2075650 (OR: 3.869, CI: 2.12, 5.84; P: 4.656e-007) y GWA_14q32.13rs11622883 (OR: 2.285, CI: 1.49, 3.48; P: 0.0001059), el riesgo para LOAD incrementa en los portadores de los alelos G y A, respectivamente (Tabla 5). Aunque estos polimorfismos ya han sido previamente identificados en población Europea, asiática, africana, estadounidense, entre otras; estos resultados constituyen el primer reporte de asociación en población Colombiana (Yu, Seltman et al. 2007; Roses 2010).

El mecanismo mediante el cual las variaciones evaluadas están relacionadas con el desarrollo de la EA no es claro. Sin embargo, se podría pensar que polimorfismos en genes cercanos a APOEε4 podrían tener asociación con EA solamente por estar en LD con APOEε4. TOMM40 codifica para una proteína mitocondrial y se encuentra en LD con APOE, por esta razón la posible asociación de estos dos genes motiva a realizar estudios biológicos que busquen vincular estos dos genes con la patología Alzheimer. APOEε4 muestra interacción con la membrana externa mitocondrial induciendo toxicidad y reducción en la movilidad mitocondrial (Chang, ran Ma et al. 2005; Brodbeck J 2009). También se ha demostrado que podría existir una relación entre TOMM40 y APP ya que esta última interactúa con los complejos de las translocasas en mitocondria y se acumula tanto en la membrana externa como interna de la mitocondria facilitando la toxicidad, esto puede ser de manera isoforma dependiente de APOE (ε2, ε3, ε4) siendo la APOEε4 más afín a unirse a mitocondria y desencadenar procesos de mitotoxicidad (Devi, Prabhu et al. 2006; Lutz MW 2010).

Desde el punto de vista genético TOMM40 parece tener implicaciones en procesos relacionados con EA como la modulación de los niveles de expresión de APOE (Bekris, Millard et al. 2008; Bekris, Galloway et al. 2010). En esto podría estar implicado el polimorfismo rs2075650 (Región intrónica) que se encuentra 15 kb corriente arriba de APOE (Shen, Kim et al. 2010; Deelen, Beekman et al. 2011) y del que se encuentra asociación con la EA en la muestra estudiada aquí. Ya que TOMM40 se encuentra relacionado con la entrada y salida de moléculas en la

superficie mitocondrial, polimorfismos en este gen han sido ampliamente asociados con la EA en diferentes poblaciones (Rassow et al 1998, Roses et al 2010), de esta manera, aunque la variación rs2075650 se encuentra en una región no codificante podría tener implicaciones biológicas.

Debido a su localización intrónica, rs2075650 por si solo podría ser no funcional, sin embargo puede realizar asociaciones alélicas con variantes funcionales o algún elemento regulador que permitirían modular la expresión del gen. rs2075650 recientemente se ha descrito como parte de un bloque haplotípico que conforma un elemento *enhancer* putativo (TOMM40 IVS2-4) y que podría modular la expresión no solo en TOMM40 sino en genes cercanos como APOE y APOC1. Bekris, 2012 hipotetiza que la actividad promotora de los tres genes (APOE, TOMM40 y APOC1) podría estar influenciada por elementos reguladores previamente establecidos ME1 y BCR1 y elementos putativos como TOMM40 IVS2-4 y TOMM40 IVS6 Poly-T (Shih, Allan et al. 2000; Zheng, Pennacchio et al. 2004).

De acuerdo con la hipótesis de Bekris, 2012 los haplotipos conformados en regiones específicas de los promotores de los tres genes (APOE, TOMM40 y APOC1) y haplotipos en los elementos *enhancers*, estos haplotipos podrían actuar como elementos *enhancers* o silenciadores para APOE o TOMM40 dependiendo el tipo celular analizado; esto sugiere una maquinaria regulatoria transcripcional compleja que puede ser modulada por distintos haplotipos conformados por SNPs distantes (Bekris, Lutz et al. 2012). Además se sugiere que en ausencia de APOEε4, los haplotipos en promotores y *enhancers* podrían influenciar la regulación en TOMM40 y APOE, lo cual sería relevante ya que la asociación entre SNPs de TOMM40 y EA no sería simplemente un efecto de LD con APOE sino que se debe a un efecto modificador de haplotipos en elementos reguladores en diferentes tipos celulares. Esto podría ser importante a futuro ya que haplotipos conformados por distintos marcadores podrían ser predictores de enfermedad y ayudaran a describir futuros blancos terapéuticos.

Por otra parte, el polimorfismo rs2075650 además de estar asociado con la EA en diferentes GWAS (Harold, Abraham et al. 2009; Lambert, Heath et al. 2009; Seshadri, Fitzpatrick et al. 2010), también ha sido implicado recientemente con longevidad debido a que los portadores del alelo menor tienen un 29% de probabilidad de disminución de llegar a los 90 años; efecto que es dependiente de APOEε4 (Deelen, Beekman et al. 2011). rs2075650 cada día toma más importancia como biomarcador en CFS ya que también está relacionado con la cantidad de Aβ y tau total al igual que APOEε4 (Kim, Swaminathan et al. 2011). La potencial asociación entre TOMM40, longevidad y Aβ podría ser importante en futuras investigaciones ya que se podría entender como diferentes polimorfismos de este

gen al interactuar con APOEε4 podrían afectar el riesgo para la EA y su edad de inicio en distintas poblaciones incluyendo la nuestra.

Por otra parte, el SNP rs11622883 también asociado con LOAD en este estudio, está situado muy cerca al gen *SERPINA13* y en la región 3' del gen *GSC* (goosecoid homeobox). Algunas SERPINAS se asocian a diferentes tipos de cáncer como seno y próstata. *GSC* es un gen Homeobox que codifica para un factor de transcripción altamente conservado e involucrado en el desarrollo craneofacial y ha sido relacionado con el desarrollo de cáncer ya que se encuentra sobreexpresado en la mayoría de tumores de seno (Hartwell, Muir et al. 2006). En LOAD este polimorfismo se encuentra asociado con daño cognitivo y esta asociación es independiente del estatus de APOE (Grupe, Abraham et al. 2007; Cluett, Brayne et al. 2010); sin embargo, sus implicaciones metabólicas y relevancia en el desarrollo de la EA es desconocida.

En este estudio se encontró una tendencia de asociación con los genes *CLU*, *CR1*, *BIN1* (Tabla 9). Las asociaciones en estos genes han sido reportadas en GWAS en distintas poblaciones; sin embargo no es claro su mecanismo de acción aunque se vinculan con el metabolismo del colesterol, función del sistema inmune, disfunción sináptica y procesos de membrana celular (Morgan 2011). *CLU* y *CR1* soportan la hipótesis amiloide: *Clu* es ampliamente distribuido en cerebro y tiene relación directa con Aβ, actuando como chaperona e impidiendo la agregación de los péptidos e incrementando su despacho por la barrera hematoencefálica (Jones and Jomary 2002; Bell, Sagare et al. 2007) y *CR1* se asocia a la activación de la cascada de complemento C3 inducida por Aβ y también contribuye al despacho de Aβ, esto se ha visto in vivo en donde este proceso se disminuye en pacientes y la disminución de *CR1* se ve asociada a neurodegeneración e incremento de Ab sugiriendo un rol protector del sistema complemento en EA (Corneveaux, Myers et al. 2010; Morgan 2011). Otros genes como *BIN1* tampoco presentaron significancia estadística en este estudio, sin embargo podría ser importante ya que este gen está relacionado con la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina, con el procesamiento de APP por la vía endocítica y participa en la fagocitosis en macrófagos y está asociado con los fagosomas tempranos (Carter 2011). Estos genes resultan ser de gran importancia para la EA, aunque se está tratando de establecer su importancia biológica en las principales hipótesis del desarrollo de la EA.

Aunque existen estas asociaciones con la EA en nuestra población, al comparar los ORs con otras poblaciones encontramos discrepancias (Tabla 11), estas pueden deberse a las diferencias étnicas y ambientales de las diferentes regiones y además el tipo de muestras, tamaño y diseño utilizado en cada estudio; por esta razón sería relevante además de aumentar el tamaño de la muestra en este estudio, utilizar

marcadores informativos de ancestría (AIMs) que contribuyan a evitar posibles eventos de estratificación de la muestra utilizada tanto de pacientes como de controles.

En cuanto a la posible interacción gen-gen y gen-ambiente, aquí se encontró una interacción significativa entre el genotipo 44 de APOE y GG de TOMM40 mediante el análisis de MDR que es una herramienta ampliamente usada en estudios caso-control en entidades como el cáncer de seno y la hipertensión (Ritchie, Hahn et al. 2001; Moore JH 2002). Esta interacción también resulta importante ya que estos dos marcadores podrían actuar como moduladores de la EA; también en el análisis de haplotipos se muestra que el haplotipo conformado por GGC tiene OR: 9.03 p-valor: 1,42E-04. Además, la combinación GCA que contiene los tres alelos de riesgo para confiere un riesgo incrementado (OR: 6.00, CI: 2.45, 14.70; p: 1.1274E-5), sin embargo, el hecho de tener solamente los alelos de riesgo para TOMM40 y APOE e4 (GCT) confiere un riesgo aun mayor (OR: 9.97, CI: 2.28, 43.51; p: 1.0E-4). Esto resulta de gran importancia ya que se muestra como la combinación de alelos de SNPs en el mismo cromosoma o cromosomas distantes podrían actuar de manera conjunta para incrementar la susceptibilidad a una patología como la EA.

En cuanto a los factores ambientales, el análisis de ACM y MDR muestra que dos factores como son la escolaridad y el estado civil están relacionados con el diagnóstico Alzheimer. Estos factores pueden ayudar a explicar cómo es que entre un 10% y 40% de las autopsias con una moderada carga patológica no desarrollen demencias; lo anterior se ha tratado de explicar a través de la hipótesis de la reserva cognitiva (RC) que se refiere a la habilidad de tolerar los cambios relacionados con la edad y los cambios patológicos en el cerebro sin desarrollar síntomas clínicos o signos de enfermedad (Roe CM 2007; Meng X 2012). En este sentido, la hipótesis RC desde diferentes abordajes explica la relación entre la educación, la ocupación, el coeficiente intelectual (CI) y la demencia. RC podría tener muchas explicaciones posibles, dentro de las que se destacan cambios en la estructura cerebral y mecanismos compensatorios de las redes cerebrales. Entonces, niveles más elevados de RC se correlacionan con una menor prevalencia, incidencia y edad de inicio de demencias como la EA (Roe CM 2007; Meng X 2012)

La hipótesis RC asume que muchos aspectos de la vida protegen contra la demencia. La alfabetización, la capacidad de lectura, la inteligencia se han sugerido como los mejores medidores de CR. Un reciente metanálisis asocia el bajo nivel educativo con un riesgo elevado a desarrollar demencia con un OR de 2.61 y actividades mentales como leer revistas y libros, jugar, tomar clases, tener actividad social puede disminuir en un 12 a 30% el riesgo a demencia (Roe CM 2007; Meng X 2012).

Es claro que muchos factores de gran impacto como el bajo status socioeconómico, como baja educación y ocupación se correlacionen a exposición a otros factores ambientales como toxinas, polución, hábitos como beber fumar, malnutrición; la identificación de estos factores resulta relevante para la políticas de salud e intervenir en estos aspectos que pueden disminuir la prevalencia de la EA en países como Colombia.

Por otro lado, el estado civil también puede ser un factor predictor de demencia como la EA. Por ejemplo la hipótesis de la “protección marital” que postula que el estar casado es un factor protector en longevidad, enfermedades cardiovasculares y salud mental. El matrimonio se ha teorizado tener efectos protectores sobre la longevidad a través de integración social, control de recursos económicos, estados socioemocionales, además de su efectos en el cuidado de la salud (Waite 1995; Rendall MS 2011). Estos efectos protectores del matrimonio se han visto principalmente en hombres, con resultados inconsistentes, debido a las posibles sobreestimaciones, pequeñas muestras y bajo poder estadístico (Scarmeas N 2004; Tucker AM 2011). Sin embargo estos estudios se han enfocado principalmente en sobrevivencia, pero específicamente en Alzheimer no es claro su papel.

Por último, cabe destacar que es importante la evaluación de riesgos a desarrollar EA, de manera que la combinación del escenario genético y ambiental resulta de gran importancia en este tipo de estudios, ya que aunque se tenga predisposición genética a EA estos factores ambientales podrían exacerbar el riesgo y el inicio de la patología. En Colombia este tipo de estudios tienen que cobrar más importancia ya que se ve la necesidad de elucidar el mecanismo biológico por el cual la educación, el estado civil y estos factores resultan protectores contra el inicio de la demencia y el curso de la misma.

En resumen, los resultados aquí presentados sugieren una asociación significativa con APOE, TOMM40 y LOAD en población colombiana. TOMM40 podría estar interactuando con APOE y factores de riesgo ambientales como la escolaridad y el estado civil para modular el desarrollo de la EA en nuestra población. Al tener identificados variantes asociadas el desarrollo de la EA en Colombia, sería necesario futuras investigaciones importantes para clarificar el mecanismo de acción o ruta metabólica mediante la cual estas variaciones están implicadas al riesgo de desarrollar demencia.

5.2 Conclusiones

La enfermedad de Alzheimer constituye un problema de salud pública en nuestro país y múltiples factores genéticos y ambientales pueden contribuir al desarrollo de esta en la población. Aquí se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas para CLURs11136000, PICALM rs3851179, CR1 rs6656401 y BIN1 rs744373, TOMM40 rs2075650, PVRL2 rs6859 y APOE rs440446, SORL1 rs11218304, CR1 rs381861 y GWA_14q32.13 rs1162288, analizando un grupo de controles se reportan diferencias con las frecuencias del HapMap posiblemente debido a las diferencias en el origen ancestral de los individuos.

En cuanto a los factores genéticos asociación a EA aquí se replica la asociación entre APOEε4 y la enfermedad de Alzheimer LOAD y EAOD; además es el primer reporte de asociación con LOAD y los SNPs TOMM40 (rs2075650) y GWA_14q32.13 (rs11622883).

Se reportan haplotipos y combinaciones de genotipos entre las variaciones que confieren un riesgo a desarrollar EA, se sugiere principalmente una interacción no solo entre APOE y TOMM40 sino entre factores ambientales como la escolaridad y estado civil.

La implementación de la técnica SnapShot permitió hacer un avance en el estudio de SNPs de manera más costo- efectiva y se logró consolidar resultados importantes en el “Programa Nacional de Investigación en Genómica, Bioinformática y Estadística para estudios en enfermedades Neuropsiquiátricas. Fase I: Enfermedad de Alzheimer”

6. Perspectivas

Debido al alcance que tiene este tipo de estudios para determinar susceptibilidades genéticas que subyacen a la enfermedad de Alzheimer en poblaciones específicas, es indispensable identificar rigurosamente la posible estratificación o diferencias en la distribución de la ancestría en casos y controles; esto se puede solucionar con la evaluación de marcadores informativos de ancestría (AIMs) distribuidos ampliamente en el genoma y distinguen diferentes grupos étnicos; estos pueden ser microsatélites, SNPs y polimorfismos de inserción-delección, de estos últimos estamos adelantando la genotipificación para AT3-Indel, NBC241, APO, PV92 y FXIIB que posibilitan identificar poblaciones de origen europeo, africano e indígena en el grupo de pacientes EA y controles, con esto se puede comparar de mejor manera las frecuencias alélicas y genotípicas entre la población Colombiana y los reportes del HapMap y eliminar posibles sesgos en los resultados de asociación.

Otra punto que hay que tener en cuenta además de la estratificación es el aumento en el tamaño de la muestra, para esto se está realizando la genotipificación por SNaShot de los 10 marcadores evaluados aquí en una muestra ampliada de pacientes EA, controles y pacientes que presentan otro tipo de demencias como demencia frontotemporal, demencia vascular, MCI; entre otras, con el fin de determinar si estos SNPs aquí estudiados podrían estar asociados a otras demencias a parte de la EA.

El uso de familias afectadas con varios pacientes LOAD daría información adicional en cuanto a las susceptibilidades genéticas de estos individuos, ya que se esperaría una alta frecuencia de alelos de riesgo y es un método alternativo para evaluar genes adicionales que contribuyan al riesgo a desarrollar demencia. Por ejemplo, APOEε4 tiene una frecuencia más elevada en casos de individuos que desarrollan LOAD y que tienen historia familiar en comparación con los casos LOAD aislados; entonces, estos estudios en familias con un número importante de individuos afectados posibilitarían la identificación variantes con alta penetrancia e incrementarían el poder de este tipo de estudios.

Los estudios de asociación como el presentado aquí, deben ir de la mano de estudios más amplios que permitan tener una mayor información como los estudios epigenéticos; considerando que la expresión es un determinante de la identidad celular y está relacionada con la metilación de los residuos citosina en el DNA, sería importante evaluar patrones de metilación en los genes aquí asociados como

TOMM40 y APOE, además de la evaluación de otros genes que pueden estar diferencialmente expresados en personas afectadas con EA.

Finalmente, esta tesis se realizó dentro del marco del “Programa Nacional de Investigación en Genómica, Bioinformática y Estadística para estudios en enfermedades Neuropsiquiátricas. Fase I: Enfermedad de Alzheimer” aprobado por la DIB-Sede Bogotá y soportó muchos de los objetivos allí propuestos. Recientemente, el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS – aprobó una propuesta para la continuación de este proyecto: “Enfermedad De Alzheimer Esporádica Y Deterioro Cognitivo Leve: Estudios Clínicos, Genómicos Y Epigenéticos En Pacientes Colombianos”. COLCIENCIAS. 110154531720; en el cual se incluyen muchos de los aspectos de genómica y epigenética mencionados en las perspectivas.

Anexos

A. Anexo I. Primers usados para la amplificación por PCR de los SNPs.

SNP	GEN	PRIMER F	PRIMER R
rs11136000	CLU	5'CTCAAACCTCCTgACCCCAAgTA3'	5'TgCAgACTCCCTGAATCTTACC3'
rs3851179	PICALM	5'ACAgAgCCTgCAAACAATACAC3'	5'TgATgAAAACTCACCCCAgTCT3'
rs6656401	CR1	5'gTCAgAAATCAAgggggTTg3'	5'CCCgAACTCTgCAAACAAAT3'
rs744373	BIN1	5'CAggTTCCTCCTCAACTgC3'	5'gCCCAAAGATTAATgCTggA3'
rs2075650	TOMM40	5'TgTTCTgCTgTgggTCTCTg3'	5'TgggTAAggACACCAGgAg3'
rs6859	PVRL2	5'CTggACACAgACAgAgACAgAg3'	5'AgACACCCCTgATgTTTTCTC3'
rs440446	APOE	5'AgCTCAggggCCTCTAgAAA3'	5'ACAACCTCgTggAgTCCTgCT3'
rs11218304	SORL1	5'gCgCTCTCTgTgATCTTTgTA3'	5'TCgggCAAaggTATTACAAGAgT3'
rs2279590	CLU	5'TACTCTgACCAAgggCTgCT3'	5'AgCTTCACgACCACCTCAgT3'
rs11622883	GWA_14q32.13	5'TCCCTgCCTAgTCATTATgCTT3'	5'CTgAAgCCAACAACgAACACT3'

Primer F: Forward; Primer R: Reverse.

C. Anexo III. Condiciones de amplificación por PCR de los 10 SNPs. **PCR 1:** CLU(rs11136000), PICALM(rs3851179), CLU(rs2279590) y BIN1 (rs744373); **PCR 2:** TOMM40 (rs2075650), PVRL2 (rs6859) y APOE (rs440446); **PCR 3:** SORL1 (rs11218304), CR1 (rs3818361) y GWA_14q32.13 (rs11622883)

PCR 1	Volumen (µl)	PCR 2	Volumen (µl)	PCR 3	Volumen (µl)
Buffer Go Taq	5	Buffer Go Taq	5	Buffer Go Taq	5
CLU1 F	0.1	TOMM40 F	0.2	SORL1 F	0.2
CLU1 R	0.1	TOMM40 R	0.2	SORL1 R	0.2
PICAIM F	0.1	PVRL2 F	0.2	CR1 F	0.2
PICALM R	0.1	PVRL2 R	0.2	CR1 R	0.2
BIN1F	0.2	APOE F	0.2	GWA_14q F	0.2
BIN1R	0.2	APOE R	0.2	GWA_14q R	0.2
CLU 2F	0.2	-----		-----	
CR12 R	0.2	-----		-----	
MgCl ₂	3	MgCl ₂	2	MgCl ₂	3
dNTPs	4	dNTPs	5	dNTPs	5
Agua	9.5	Agua	4.8	Agua	8.5
Go Taq	0.3	Go Taq	4	Go Taq	0.3
DNA	2	DNA	3	DNA	2
V. total	25 µl	V. total	25 µl	V. total	25 µl

MgCl₂: Cloruro de Magnesio (Ci: 25 µM), Go taq: Taq polimerasa (promega Ci: 5u/µl). Los primers estaban Ci: 100 µM. dNTPs (Ci: 0 µM). Ci: Concentración inicial.

D. Anexo IV. Condiciones de amplificación por PCR de las PCR1, PCR2 y PCR3.

Paso		PCR 1 Y 3	PCR 2
Denaturación inicial		95 C → 4min	95 C → 4min
Denaturación	30 ciclos	95 C → 45 seg	95 C → 45 seg
Alineamiento		62 C → 40 seg	62 C → 40 seg
Extensión		72 C → 1 min	72 C → 1 min
Extensión Final		72 C → 7 min	72 C → 7 min
Conservación		8 C → ∞	8 C → ∞

Todas las PCR fueron touchdown (-0.2 C/ciclo). Para la PCR2 se hizo PCR hotstart.

E. Anexo V. Condiciones de PCR y restricción para la identificación de APOEe2, e3 y e4.

A. Condiciones de amplificación por PCR. **B.** Restricción con la enzima HhaI.

A.

Reactivo	Vol (ul)
Primer forward	2
Primer revers e	2
dNTPs	2
DMSO4	2.5
MgCl2	1.5
Taq polimerasa	0.2
DNA	2
H2O	7.8 uL

B.

Reactivo	Vol (ul)
Buffer de restricción 10x	2.0
Enzima HhaI	0.5
DNA 1µg/µ	7.0
BSA 10µg/µl	0.2
H2O	10.3

Mgcl2: Ci: 25 µM), Go taq: Taq polimerasa (promega Ci: 5u/µl). Los primers estaban Ci: 10 µM. dNTPs (Ci: 0 µM). Ci: Concentración inicial

F. Anexo VI. Condiciones para la detección de SNPs por SNaPshot y controles de la reacción.

A. Mix de reacción SNaPshot; **B.** Condiciones del control positivo y control negativo de la reacción de SNaPshot.

A.

Mix de reacción SNaPshot Multiplex	5µl
Pool PCR	3µl
Pool Primers	1µl
Agua	1µl
TOTAL	10µl

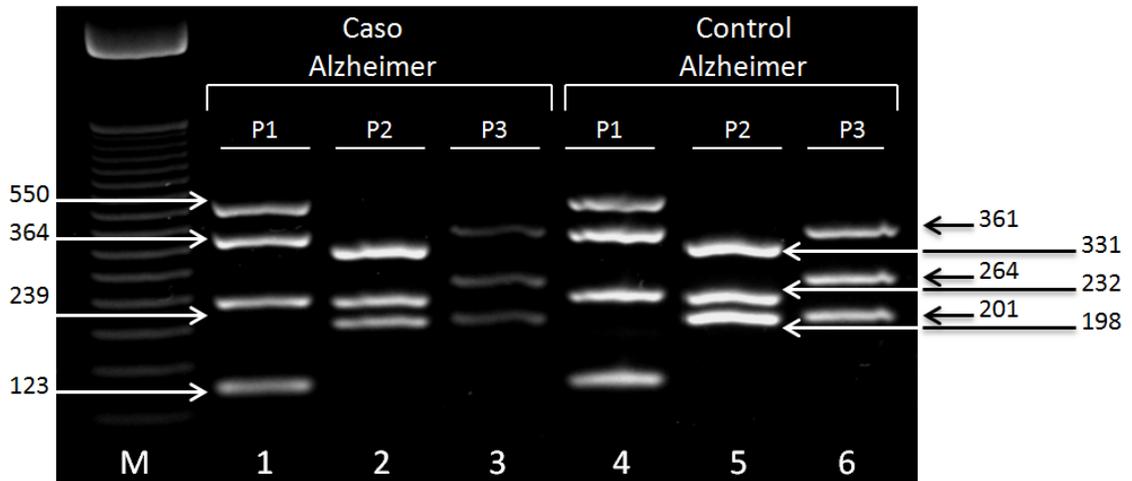
B.

	Control positivo (µL)	Control negativo (µL)
Mix de reacción SNaPshot Multiplex	5	5
Templete control SNaPshot Multiplex	2	0
Mix control de primer SNaPshot Multiplex	1	1
Agua desionizada	2	4
Total	10	10

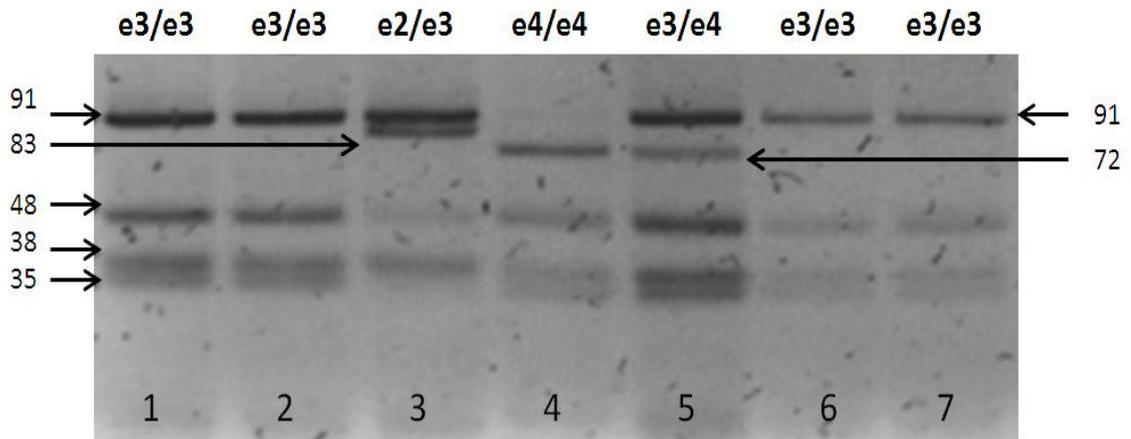
G. Anexo VII. Foto de las ampliificaciones de las PCR1 (P1), PCR2 (P2) y PCR3 (P3) y restricción para identificar APOE e2, e3 y e4 vistos a través de luz U.V.

A. Gel de agarosa a 1.5% muestra los carriles 1-3 caso con EA y 4-6 control para P1 (550,364,239 y 123 bp), P2 (331,232,198bp) y P3 (361,264 y 201bp).M: Marcador de peso. **B.** Gel en agarosa 4% muestra genotipos APOEe3/3 (91, 48,38 y 35bp) en los carriles 1,2,6 y 7; APOEe2/3 (91,83, 48,38 y 35 bp) carril 3; APOE e4/4 (72, 48,38 y 35bp) en el carril 4 y APOEe3/e4 (91,72, 48,38 y 35bp) en el carril 5.

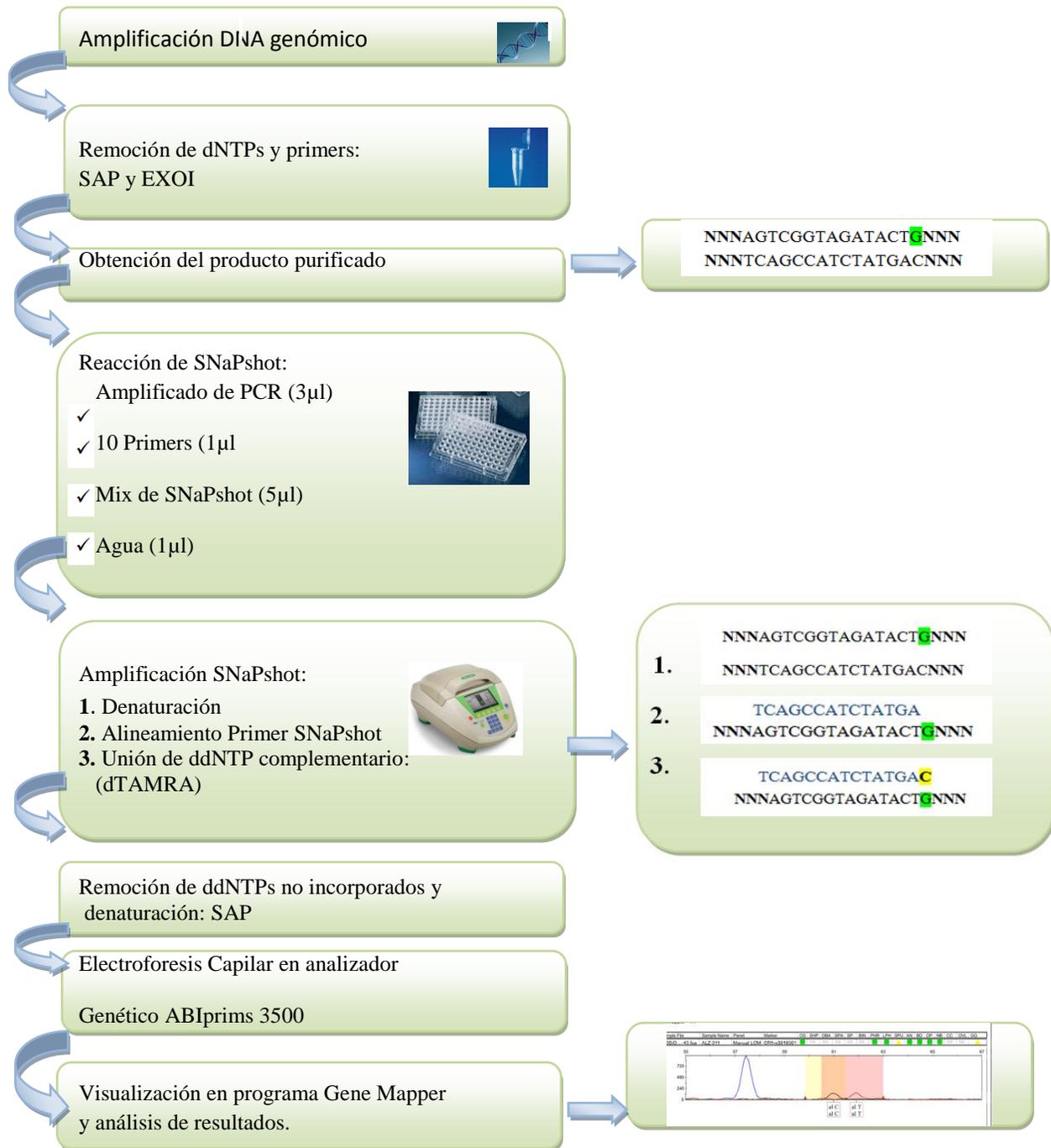
A.



B.

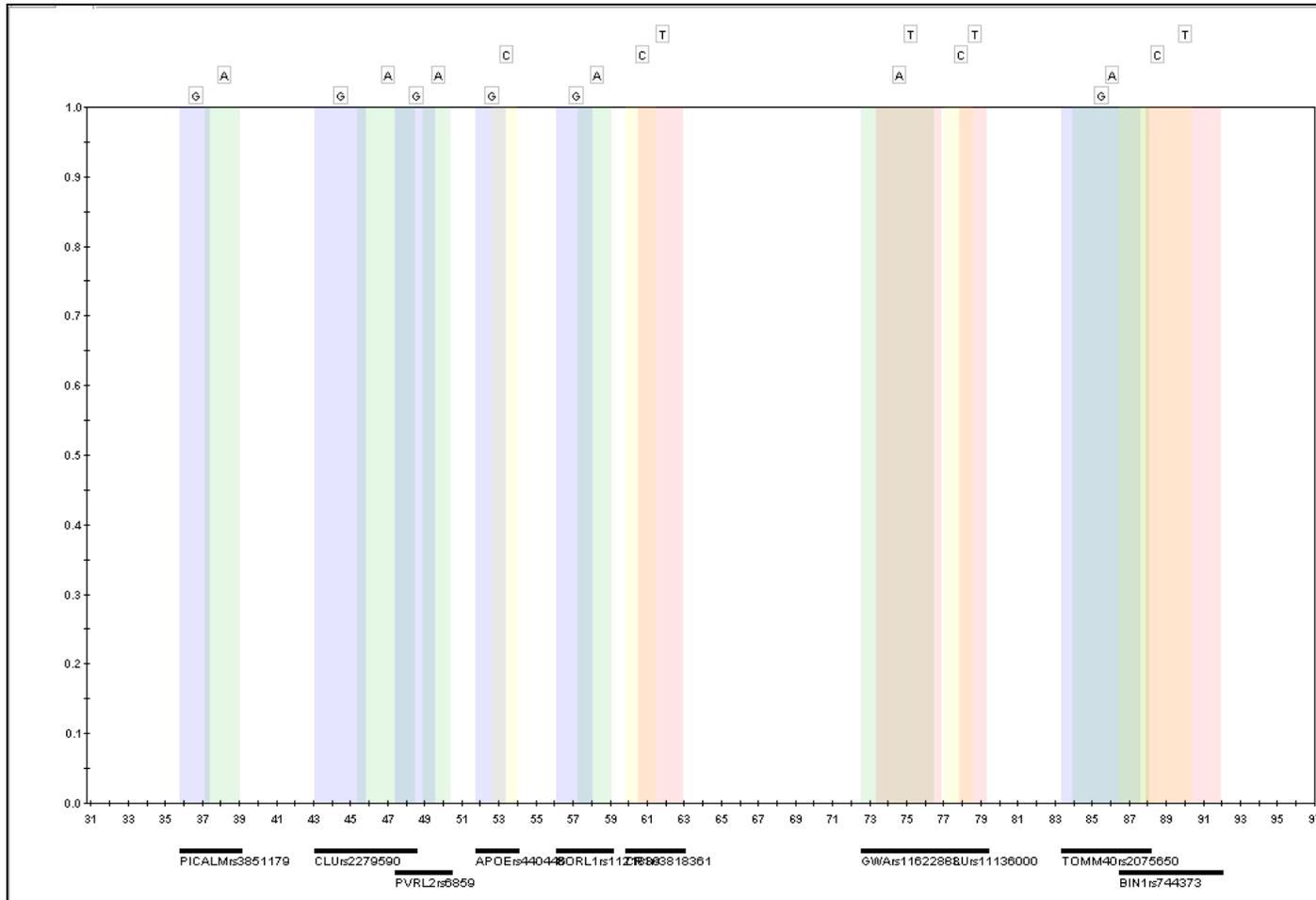


H. Anexo VIII. Esquema de la tecnología SNaPshot (Applied Biosystems) para detección de SNPs.



Tomado y modificado del protocolo de ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit. El nucleótido en verde y el nucleótido en amarillo indican el SNP de interés y el nucleótido complementario, respectivamente.

I. Anexo IX. Esquema de los paneles de detección de los SNPs por la metodología SNaPshot visualizados en el software GeneMapper 3.5.



J. Anexo X. Equilibrio de Hardy Weinberg (HW) para individuos LOAD y EAOD y sus controles.

A. HW Para LOAD. B. HW para EAOD. CHR: cromosoma, AFF: Afectados, UNAFF: Controles, A1 y A2: Los alelos de cada SNP; O: Observado; E: Esperado; P: p-valor.

A.

CHR	SNP	TEST	A1	A2	GENO	O (HET)	E (HET)	P
1	CR1rs3818361	ALL	T	C	5/54/148	0.2609	0.2614	1
1	CR1rs3818361	AFF	T	C	5/25/69	0.2525	0.291	0.1763
1	CR1rs3818361	UNAFF	T	C	0/29/79	0.2685	0.2325	0.208
2	BIN1rs744373	ALL	C	T	20/53/114	0.2834	0.3737	0.001477
2	BIN1rs744373	AFF	C	T	11/32/51	0.3404	0.4095	0.128
2	BIN1rs744373	UNAFF	C	T	9/21/63	0.2258	0.3314	0.003595
8	CLUrs2279590	ALL	A	G	45/68/100	0.3192	0.4667	4.51e-006
8	CLUrs2279590	AFF	A	G	25/36/45	0.3396	0.4822	0.002499
8	CLUrs2279590	UNAFF	A	G	20/32/55	0.2991	0.4465	0.0009448
8	CLUrs11136000	ALL	T	C	18/122/80	0.5545	0.4603	0.003226
8	CLUrs11136000	AFF	T	C	12/54/42	0.5	0.4614	0.5308
8	CLUrs11136000	UNAFF	T	C	6/68/38	0.6071	0.4592	0.0008508
10	SORL1rs1121830	ALL	G	A	16/73/129	0.3349	0.3657	0.2
10	SORL1rs1121830	AFF	G	A	10/32/64	0.3019	0.3702	0.06547
10	SORL1rs1121830	UNAFF	G	A	6/41/65	0.3661	0.3612	1
11	PICALMrs3851179	ALL	A	G	11/148/62	0.6697	0.4734	3.896e-010
11	PICALMrs3851179	AFF	A	G	7/69/34	0.6273	0.4699	0.0005237
11	PICALMrs3851179	UNAFF	A	G	4/79/28	0.7117	0.4766	1.085e-007
14	GWArS11622883	ALL	A	T	19/90/117	0.3982	0.406	0.7452
14	GWArS11622883	AFF	A	T	14/54/44	0.4821	0.4641	0.8387
14	GWArS11622883	UNAFF	A	T	5/36/73	0.3158	0.3221	0.7751
19	PVRL2rs6859	ALL	A	G	21/95/91	0.4589	0.4428	0.6414
19	PVRL2rs6859	AFF	A	G	8/52/40	0.52	0.4488	0.1793
19	PVRL2rs6859	UNAFF	A	G	13/43/51	0.4019	0.4369	0.3846
19	TOMM40rs2075650	ALL	G	A	20/53/141	0.2477	0.3401	0.0001818
19	TOMM40rs2075650	AFF	G	A	14/40/53	0.3738	0.4336	0.1798

19	TOMM40rs2075650	UNAFF	G	A	6/13/88	0.1215	0.2063	0.0004713
19	APOErs440446	ALL	C	G	21/75/86	0.4121	0.4362	0.4964
19	APOErs440446	AFF	C	G	10/33/45	0.375	0.4209	0.3147
19	APOErs440446	UNAFF	C	G	11/42/41	0.4468	0.4491	1
19	APOErs429358	ALL	C	T	8/69/127	0.3382	0.3299	0.8337
19	APOErs429358	AFF	C	T	8/57/48	0.5044	0.4373	0.134
19	APOErs429358	UNAFF	C	T	0/12/79	0.1319	0.1232	1
19	APOErs7412	ALL	T	C	0/21/183	0.1029	0.09764	1
19	APOErs7412	AFF	T	C	0/9/104	0.07965	0.07647	1
19	APOErs7412	UNAFF	T	C	0/12/79	0.1319	0.1232	1

B.

CHR	SNP	TEST	A1	A2	GENO	O(HET)	E(HET)	P
1	CR1rs3818361	ALL	T	C	2/9/41	0.1731	0.2188	0.1601
1	CR1rs3818361	AFF	T	C	2/5/20	0.1852	0.2778	0.1213
1	CR1rs3818361	UNAFF	T	C	0/4/21	0.16	0.1472	1
2	BIN1rs744373	ALL	C	T	8/12/27	0.2553	0.4183	0.01163
2	BIN1rs744373	AFF	C	T	3/7/13	0.3043	0.4055	0.2993
2	BIN1rs744373	UNAFF	C	T	5/5/14	0.2083	0.4297	0.01528
8	CLUrs2279590	ALL	A	G	13/25/18	0.4464	0.496	0.4327
8	CLUrs2279590	AFF	A	G	6/13/10	0.4483	0.4905	0.7085
8	CLUrs2279590	UNAFF	A	G	7/12/8	0.4444	0.4993	0.6996
8	CLUrs11136000	ALL	T	C	5/29/24	0.5	0.4463	0.5552
8	CLUrs11136000	AFF	T	C	5/13/11	0.4483	0.4786	0.7109
8	CLUrs11136000	UNAFF	T	C	0/16/13	0.5517	0.3995	0.06928
10	SORL1rs1121830	ALL	G	A	2/22/33	0.386	0.3521	0.71
10	SORL1rs1121830	AFF	G	A	1/12/17	0.4	0.3578	1
10	SORL1rs1121830	UNAFF	G	A	1/10/16	0.3704	0.3457	1
11	PICALMrs3851179	ALL	A	G	5/36/16	0.6316	0.4814	0.02833
11	PICALMrs3851179	AFF	A	G	1/15/11	0.5556	0.4314	0.2101
11	PICALMrs3851179	UNAFF	A	G	4/21/5	0.7	0.4994	0.06455
14	GWAr11622883	ALL	A	T	7/33/18	0.569	0.482	0.2742
14	GWAr11622883	AFF	A	T	4/19/7	0.6333	0.495	0.2646
14	GWAr11622883	UNAFF	A	T	3/14/11	0.5	0.4592	1
19	PVRL2rs6859	ALL	A	G	12/22/16	0.44	0.4968	0.4065
19	PVRL2rs6859	AFF	A	G	10/7/8	0.28	0.4968	0.04157
19	PVRL2rs6859	UNAFF	A	G	2/15/8	0.6	0.4712	0.3912

19	TOMM40rs2075650	ALL	G	A	8/13/35	0.2321	0.3838	0.004481
19	TOMM40rs2075650	AFF	G	A	7/8/13	0.2857	0.477	0.0455
19	TOMM40rs2075650	UNAFF	G	A	1/5/22	0.1786	0.2188	0.3465
19	APOErs440446	ALL	C	G	7/14/30	0.2745	0.3983	0.03313
19	APOErs440446	AFF	C	G	4/4/18	0.1538	0.355	0.008747
19	APOErs440446	UNAFF	C	G	3/10/12	0.4	0.4352	0.6626
19	APOErs429358	ALL	C	T	5/17/35	0.2982	0.3615	0.264
19	APOErs429358	AFF	C	T	5/12/13	0.4	0.4644	0.4485
19	APOErs429358	UNAFF	C	T	0/5/22	0.1852	0.168	1
19	APOErs7412	ALL	T	C	1/4/52	0.07018	0.09972	0.1292
19	APOErs7412	AFF	T	C	1/0/29	0	0.06444	0.01695
19	APOErs7412	UNAFF	T	C	0/4/23	0.1481	0.1372	1

K. Anexo XI. Combinación de genotipos de los SNPs evaluados realizado en Haploview.

En A y B se muestran la combinación de los 12 SNPs, con sus frecuencias. En B además se muestra la proporción de casos y controles que presentan la combinación, el chi-cuadrado y el p-valor.

A.

```

Block 1
      123456789101112
GCAGAGTCGTTT .104
GCAGAGTCGTCC .071
ACAGAGTCGTTT .027
ATAGAGTCATTC .025
ATAGACTCGTTT .023
GCAGACTCATTC .022
ATAGGGCCGATC .022
ATGGACTCATTC .020
GCGAAGTCGTTT .017
ATAGAGTCGATT .014
GCAGACTCGTTT .014
GCGGAGTCATTC .013
GCAGACTCAATC .013
GCAAAGTCAATC .013
GTAAACTCGTTT .012
GCAAGGCCAATC .012
ATAAAGTCATTC .012
ATAAACTCGTTT .011
GCAAACATCATCC .011
GCAGAGCCATTT .010
    
```

B.

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
GCAGAGTCGTTT	0.104	19.7 : 195.6, 26.9 : 198.3	0.914	0.339
GCAGAGTCGTCC	0.071	14.8 : 200.5, 17.0 : 208.1	0.079	0.7791
ACAGAGTCGTTT	0.027	7.2 : 208.1, 4.8 : 220.4	0.626	0.4287
ATAGAGTCATTC	0.025	3.1 : 212.2, 7.9 : 217.2	1.93	0.1647
ATAGACTCGTTT	0.023	4.5 : 210.8, 5.6 : 219.6	0.067	0.7958
GCAGACTCATTC	0.022	1.8 : 213.5, 7.9 : 217.2	3.711	0.0541
ATAGGGCCGATC	0.022	7.8 : 207.5, 1.9 : 223.3	3.915	0.0478
ATGGACTCATTC	0.020	6.2 : 209.1, 2.6 : 222.5	1.672	0.196
GCGAAGTCGTTT	0.017	1.7 : 213.6, 6.0 : 219.1	2.291	0.1301
ATAGAGTCGATT	0.014	4.7 : 210.6, 1.4 : 223.7	1.876	0.1707
GCAGACTCGTTT	0.014	2.5 : 212.8, 3.6 : 221.6	0.138	0.7105
GCGGAGTCATTC	0.013	1.2 : 214.1, 4.9 : 220.3	2.174	0.1403
GCAGACTCAATC	0.013	3.5 : 211.8, 2.2 : 222.9	0.343	0.5581
GCAAAGTCAATC	0.013	2.6 : 212.7, 3.1 : 222.1	0.016	0.8979
GTAAACTCGTTT	0.012	0.7 : 214.6, 4.8 : 220.4	2.797	0.0944
GCAAGGCCAATC	0.012	2.7 : 212.6, 2.8 : 222.4	0.0	0.9984
ATAAAGTCATTC	0.012	2.2 : 213.1, 2.9 : 222.2	0.065	0.7985
ATAAACTCGTTT	0.011	1.5 : 213.8, 3.6 : 221.6	0.757	0.3843
GCAAACATCATCC	0.011	3.3 : 212.0, 1.4 : 223.8	0.872	0.3505
GCAGAGCCATTT	0.010	2.9 : 212.4, 1.8 : 223.4	0.312	0.5767

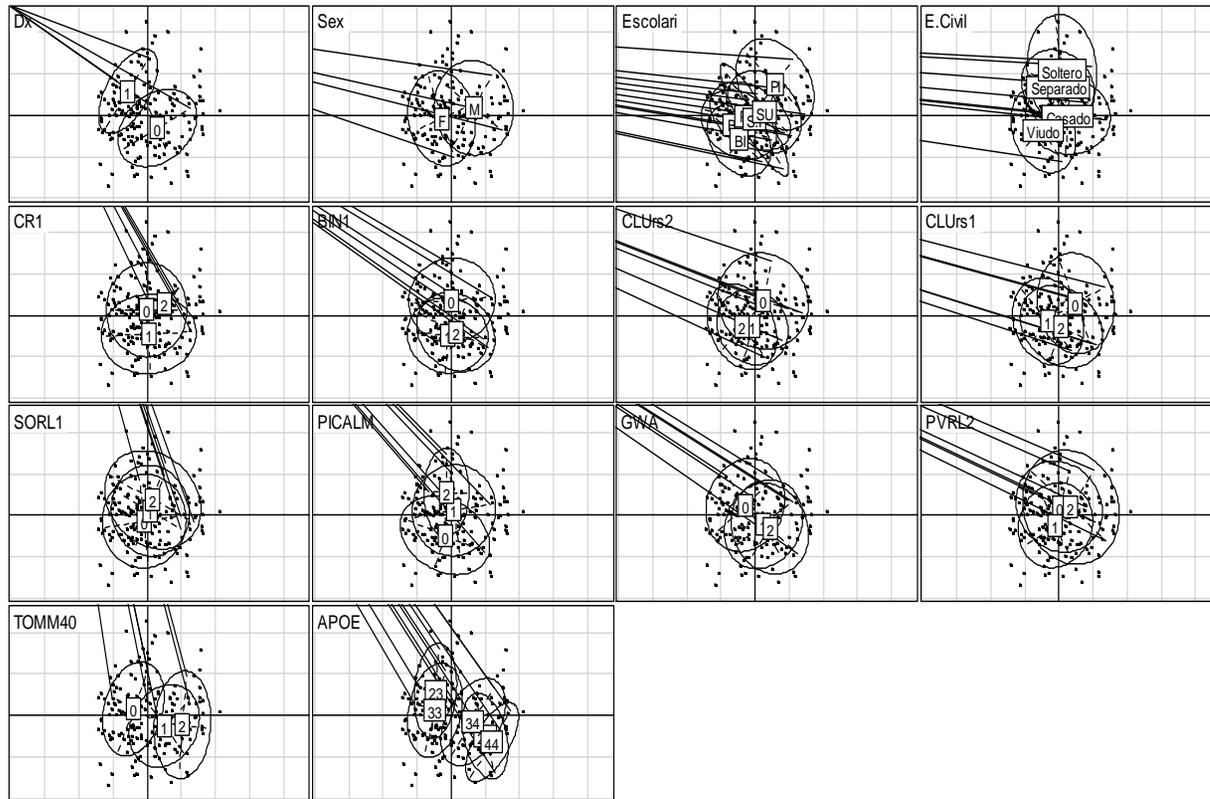
L. Anexo XII. Datos de los individuos con EA utilizados en el análisis de correspondencia múltiple.

Diagnóstico	Género	Escolaridad	E.Civil	CR1	BIN1	CLUrs2	CLUrs1	SORL1	PICALM	GWA	PVRL2	TOMM40	APOE
D0:110	F:118	BC:14	Casado :90	0:128	0:94	0:76	0:60	0:91	0: 42	0:82	0:69	0:103	23: 8
D1: 58	M: 50	BI :36	Separado:13	1: 38	1:50	1:57	1:95	1:60	1:114	1:73	1:77	1: 47	24: 3
		PC:37	Soltero :12	2: 2	2:24	2:35	2:13	2:17	2: 12	2:13	2:22	2: 18	33:94
		PI :30	Viudo :53										34:55
		SI: 8											44: 8
		SU :43											

D0: Pacientes con EA, D1: Controles, F: Femenino, M: Masculina, SI: Sin instrucción, PC: Primaria completa, PI: Primaria incompleta, BC: Bachillerato completo, BI: Bachillerato incompleto, SU: Superior. 0: genotipo homocigoto de mayor frecuencia, 1: genotipo heterocigoto, 2: genotipo homocigoto de menor frecuencia. CLUrs1: rs11136000, CLUrs2: rs2279590

M. Anexo XIII. Análisis de correspondencia múltiple.

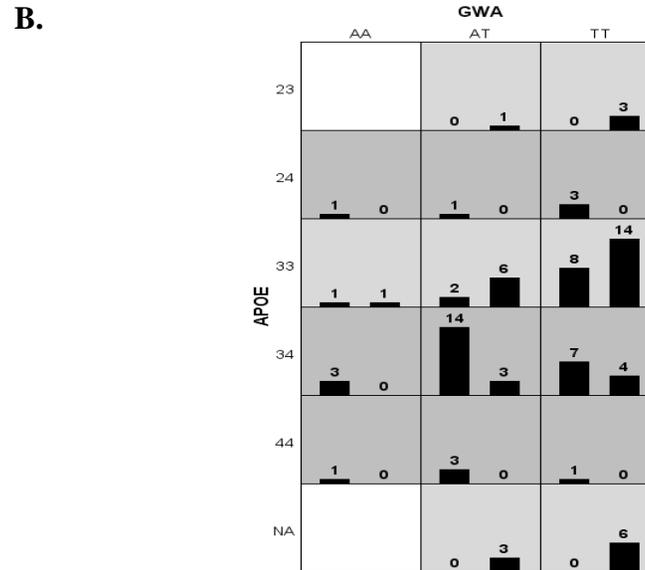
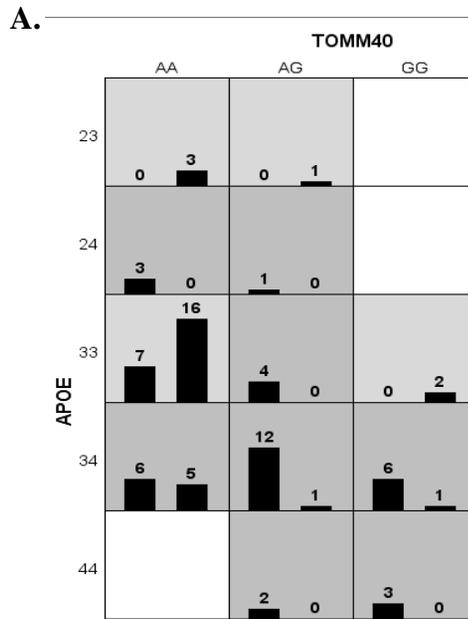
Se muestra las agrupaciones de los casos y controles según la distribución de cada variable.



Dx: Diagnostico, 1: Control, 0: Caso, Sex: Genero, F: Fememnino, M: Masculino

N. Anexo XIV. Grafico de la distribución de variables de bajo riesgo y de alto riesgo para la EA realizado en el programa MDR.

A y B. Grafico en MDR que muestra la posible asociación entre los SNPs de riesgo TOMM40 y GWA_14q32.13 con APOE. Las barras representan la distribución hipotética de casos (derecha) y controles (izquierda) con cada combinación entre genotipos. Las celdas oscuras representan la combinación de alto riesgo mientras que las celdas claras representan bajo riesgo. Las celdas blancas representan las combinaciones para las cuales no hay datos.



O. Anexo XV. Consideraciones Éticas

Los procedimientos requeridos para la realización del presente estudio fueron realizados y consisten en: Entrevista, Toma de Datos Clínicos, Examen Físico, y Venopunción, los cuales se enmarcan como de RIESGO MÍNIMO, según el Artículo 11 de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud. La selección de los pacientes se realizó respetando la independencia y voluntad de cada una de sus familias o de los individuos en particular, en la que expresan su deseo de participar en la investigación y la firma del consentimiento informado respectivo, mediante el cual el sujeto de investigación, o en su caso, su representante legal, autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos a que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna. Para proteger la privacidad del individuo sujeto a investigación, en todo momento se mantendrá la más estricta confidencialidad, y su nombre no será mencionado en ninguno de los informes científicos resultado de este estudio. En caso de que los sujetos a estudio decidan no continuar en la investigación, será respetada su decisión sin que esto afecte la calidad de sus servicios médicos. En caso de cualquier riesgo o daño al sujeto de investigación, se proporcionará la atención médica para aliviar el problema al sujeto que lo sufra sin perjuicio de la indemnización que legalmente le corresponda.

P. Anexo XVI. Consentimiento Informado Pacientes

Aceptación Para Participar En Proyectos De Investigacion En Enfermedad De Alzheimer

De acuerdo con lo establecido en los ART. 14, 15 y 16 de la RES. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de la Republica de Colombia.

La Enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, principal causa de demencia que aflige a una importante proporción de la población y que tienden al aumento a medida que las poblaciones envejecen. El Grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, en conjunto con varios médicos e investigadores en diferentes ciudades de Colombia, está llevando a cabo una investigación que busca conocer más acerca de como los genes afectan el riesgo de una persona de tener Enfermedad de Alzheimer en la población.

Nosotros deseamos obtener una muestra de sangre suya en este estudio debido a que usted es una persona afectada con esta enfermedad y que consulta a uno de los médicos especialistas que participan en este proyecto. Nosotros creemos que por lo menos 100 personas participarán y facilitarán una muestra de sangre para nuestro estudio.

¿Por qué se realiza este estudio?

Este estudio se está realizando debido a que las enfermedades neurológicas y psiquiátricas causan problemas de salud serios en muchas personas. Se ha descubierto que el riesgo de una persona para desarrollar enfermedades neurológicas y psiquiátricas está relacionado con algunos factores ambientales y que varios genes puedan estar relacionados con esas enfermedades y se espera encontrar más genes relacionados en el futuro.

El propósito de nuestro estudio es estudiar más acerca de cuales genes son los más importantes para la Enfermedad de Alzhiemer en población colombiana. También deseamos saber como los factores ambientales, tales como dieta, ejercicio y otros estilos de vida, interactúan con esos genes en las personas; en general, la historia de vida se constituye parte fundamental de nuestro estudio. Esto podrá ayudar a decidir si el cambio de estos factores ambientales pueden prevenir esas enfermedades o retardar su curso.

¿Quiénes están involucrados en el estudio y como se participa?

Si usted decide participar se le pedirá facilitar una muestra de sangre para este estudio, nosotros extraeremos alrededor de 10 cc (más o menos 2 cucharaditas) de sangre de una vena de su brazo. La sangre será llevada a los Laboratorios del Grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, donde serán estudiados genes que pueden jugar un papel en el desarrollo de las enfermedades mencionadas.

Nosotros (El Grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia) realizaremos, algunas preguntas de su estado de salud mental actual, y haremos algunas preguntas sobre la historia de enfermedades en usted y su familia, sus hábitos de ejercicio, dieta, actividad mental y en general sobre su historia de vida. Usted puede escoger no responder alguna de las preguntas.

¿Cómo la información acerca de Usted se mantendrá de manera privada?

Una vez nosotros tomemos su muestra de sangre, nosotros le asignaremos un número de código. Nosotros separaremos de su muestra de sangre su nombre y cualquier otra información que lo pueda identificar. Mantendremos los archivos que unen su nombre al número de código en un cajón con llave. Solo el investigador principal podrá mirar esos archivos guardados.

Mantendremos de manera privada, con el fin de que otras personas no los conozcan, los resultados de las pruebas que se le realicen y la información que usted nos dé. Su nombre y otros datos que puedan identificarlo a usted no aparecerán cuando nosotros presentemos este estudio o publiquemos los resultados del mismo en revistas científicas médicas.

¿Cuáles son los riesgos del estudio?

Las venas y las arterias varían en tamaño de un paciente a otro y de un lado del cuerpo a otro, razón por la cual extraer sangre de algunas personas puede ser más difícil que de otras, en este sentido los riesgos de la extracción de sangre incluyen aparición de un dolor leve e hinchazón alrededor del sitio de la venopunción.

Otros riesgos asociados con la extracción de sangre son leves, pero pueden ser: sangrado excesivo, sensación de mareo, hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel) infección (un riesgo leve cada vez que se presenta ruptura de la piel). Frente a esto se tomarán todas las medidas para prevenir la infección. Como se menciona anteriormente, se tomarán todos los cuidados que aseguren la confidencialidad y privacidad de los datos acerca de usted.

¿Cuales son los beneficios de participar?

Por ahora, usted no obtendrá ningún beneficio directo al proveer una muestra de sangre para este estudio, pero usted nos ayudará a conocer más acerca de los genes y otros factores que conducen a las enfermedades del cerebro, y los resultados de este tipo de estudios pueden ayudar en el futuro para la prevención y tratamiento de estas enfermedades en otros miembros de su familia y de la comunidad.

¿Cuales son los costos del estudio?

El proveer una muestra de sangre para este estudio no tendrá ningún costo y no se le cobrará nada por las pruebas y exámenes que se le realicen dentro de la investigación. A usted no se le pagará por su participación en este estudio. En el caso remoto que usted se vea afectado mientras se le toma la muestra de sangre, se le darán los primeros auxilios necesarios y de llegar a ser necesario Usted tendrá derecho a servicio médico sin costo alguno para Usted. Su muestra de sangre

nunca será usada para desarrollar un invento o una aplicación que llegare a ser vendida o patentada.

¿Cuales son la Justificación y objetivos del estudio?

En otras regiones del mundo incluyendo Estados Unidos, Japón y Europa se han estudiado las variaciones genéticas que pudieran contribuir en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, sin embargo en poco sabemos sobre las particularidades que pudieran estar llevando al desarrollo de esta enfermedad en nuestra población Colombiana.

Por tanto el objetivo principal de nuestra investigación es el de mejorar el entendimiento acerca de los genes y otros factores afectan la salud y la enfermedad de Alzheimer en la Población Colombiana, por lo que se estudiarán genes que pueden estar relacionados con la misma.

¿Cómo encontraré los resultados de este estudio?

Los estudios que nosotros hacemos en las muestras de sangre son para aumentar el conocimiento acerca de cómo los genes y otros factores afectan la salud y la enfermedad. El conocimiento que estamos recogiendo al estudiar grupos de personas todavía es muy preliminar para tener un impacto inmediato sobre el tratamiento o prevención en las personas. Por estas razones, nosotros no daremos a usted los resultados de nuestras investigaciones realizadas en su muestra de sangre de manera individual. Sin embargo, se realizarán conferencias acerca de los resultados que nosotros hemos obtenido en nuestras investigaciones. Estas conferencias no darán los resultados genéticos de manera individual, sino que le mostrará los resultados obtenidos con varias personas estudiadas y lo que estamos aprendiendo acerca de los genes y las enfermedades neurológicas. Además, nosotros publicaremos lo que encontremos en revistas médicas sin dar datos individuales.

¿Cuáles son mis derechos como participante?

Usted es libre de participar en este estudio. No habrá sanciones o perdidas de beneficios si usted no desea tomar parte del mismo. Si usted decide participar en este estudio, usted puede abandonarlo en cualquier momento. Usted tiene derecho a que nosotros le demos una copia de este consentimiento para que usted la guarde en sus archivos.

¿A quién puedo llamar si tengo preguntas o problemas?

Sí usted tiene alguna pregunta acerca de este estudio, contacte al Dr. Humberto Arboleda, uno de los investigadores de este estudio (Tel: 3165000 ext 11613).

Aceptación para participar en proyecto de investigación

Yo he leído detenidamente la totalidad de este Documento de consentimiento informado y he tenido la oportunidad de hacer preguntas y mis inquietudes han sido resueltas. Yo entiendo que el dar una muestra para el estudio es mi elección, entiendo el riesgo que representa y entiendo la justificación del estudio.

Comprendo que los resultados individuales genéticos del estudio no me serán dados. He recibido una copia de este consentimiento para guardarlo. Entiendo *quiénes están involucrados en el estudio y como se participa, y de igual forma, cuales son mis derechos como participante, incluyendo decidir abandonar el estudio en cualquier momento y tener una copia de todo el documento de consentimiento informado, donde esta explícito cuales son los riesgos del estudio dados por edema y dolor en el sitio de la venopunción, y entiendo cómo se mantendrá mi privacidad; también entiendo que* el proveer una muestra de sangre para este estudio no tendrá ningún costo y no se me cobrará nada por las pruebas y exámenes que se le realicen dentro de la investigación.

Yo acepto dar una muestra de sangre para este estudio. Mi muestra de sangre será utilizada únicamente para lo especificado en este estudio. Cualquier otra utilización requeriría que en el futuro yo diera otra autorización en la que consintiera que fuere usada en otra investigación.

La Enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, principal causa de demencia que aflige a una importante proporción de la población y que tienden al aumento a medida que las poblaciones envejecen. Muchas investigaciones han determinado la importancia que tiene la genética en las diferentes formas conocidas de la enfermedad, la mayoría de las cuales han sido poco analizadas en nuestro medio, de allí la importancia de este tipo de estudios en nuestra población.

Yo _____ con C.C Numero _____ y yo _____ como representante legal de _____ Con C.C Numero _____ Acepto (aceptamos) voluntariamente la participación de nuestro familiar como paciente en este proyecto de investigación que se adelanta en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, relacionado con la Enfermedad de Alzheimer.

Acepto (aceptamos) que se tome una muestra de sangre por venopunción para los estudios genéticos, particularmente moleculares, que se requieran en estas

investigaciones, conociendo que lleva un riesgo (mínimo) y cuyos resultados serán de importante beneficio para el conocimiento de la enfermedad de Alzheimer. Esta participación es completamente voluntaria y tengo (tenemos) conocimiento de los objetivos de estas investigación y del manejo ético y correcto que los investigadores del Instituto de Genética darán a la información consignada en la Historia Clínica y a las muestras de sangre; al igual que en cualquier momento, de acuerdo a las circunstancias y el estado de la investigación, tengo la posibilidad de obtener información sobre los resultados de los estudios realizados. Tengo así mismo la libertad para retirar este consentimiento, en cualquier momento del estudio, y no seguir participando en la investigación, sin ningún efecto negativo para mí ni para mis familiares.

Autorizo, que de ser necesario se publiquen con datos científicos los datos de la Historia Clínica, bajo las normas nacionales (Resolución Numero 008430 de 1993 del Ministerio de Salud) e internacionales que regulan estas actividades en **donde no se da a conocer ningún tipo de identificación** personal de los que participen en el estudio, manteniendo la privacidad. Acepto que se me han resuelto todas las dudas y he entendido las explicaciones que me han dado los genetistas del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, teniendo derecho a recibir información actualizada durante el estudio. En caso de causarse algún daño como consecuencia del estudio, el paciente dispondrá de tratamiento *médico* e indemnización.

Fecha: _____
Representante Legal _____ C.C. _____
Dirección y Teléfono _____
Testigo: _____ C.C. _____
Dirección y Teléfono _____

Q. Anexo XVII: Consentimiento Informado Controles

Formato de consentimiento informado para individuos controles.

Yo he leído detenidamente la totalidad de este Documento de consentimiento informado y he tenido la oportunidad de hacer preguntas y mis inquietudes han sido resueltas. Yo entiendo que el dar una muestra para el estudio es mi elección, entiendo el riesgo que representa y entiendo la justificación del estudio.

Comprendo que los resultados individuales genéticos del estudio no me serán dados. He recibido una copia de este consentimiento para guardarlo. Entiendo *quiénes están involucrados en el estudio y como se participa, y de igual forma, cuales son mis derechos como participante, incluyendo decidir abandonar el estudio en cualquier momento y tener una copia de todo el documento de consentimiento informado, donde esta explícito cuales son los riesgos del estudio dados por edema y dolor en el sitio de la venopunción, y entiendo cómo se mantendrá mi privacidad; también entiendo que el proveer una muestra de sangre para este estudio no tendrá ningún costo y no se me cobrará nada por las pruebas y exámenes que se le realicen dentro de la investigación.*

Yo acepto dar una muestra de sangre para este estudio. Mi muestra de sangre será utilizada únicamente para lo especificado en este estudio. Cualquier otra utilización requeriría que en el futuro yo diera otra autorización en la que consintiera que fuere usada en otra investigación.

La Enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, principal causa de demencia que aflige a una importante proporción de la población y que tienden al aumento a medida que las poblaciones envejecen. Muchas investigaciones han determinado la importancia que tiene la genética en las diferentes formas conocidas de la enfermedad, la mayoría de las cuales han sido poco analizadas en nuestro medio, de allí la importancia de este tipo de estudios en nuestra población.

Yo _____ Con C.C Numero _____ Acepto voluntariamente mi participación como individuo control sano en el proyecto de Investigación "Estudios Genéticos en Enfermedad de Alzheimer y Enfermedad de Parkinson: Análisis de genes de susceptibilidad en una muestra de pacientes colombianos que se adelanta en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Acepto que se tome una muestra de sangre por venopunción para los estudios genéticos, particularmente moleculares, que se requieran en esta

investigación, la cual lleva un riesgo mínimo pero cuyos resultados serán de importante beneficio para el conocimiento de la enfermedad.

Esta participación es completamente voluntaria y tengo conocimiento de los objetivos de esta investigación y del manejo ético y correcto que los investigadores del Instituto de Genética darán a la información consignada en la Historia Clínica y a las muestras de sangre; al igual que en cualquier momento, de acuerdo a las circunstancias y el estado de la investigación, tengo la posibilidad de obtener información sobre los resultados de los estudios realizados. Tengo así mismo la libertad para retirar este consentimiento y no seguir participando en la investigación, sin ningún efecto negativo para mí.

Autorizo, que de ser necesario se publiquen con datos científicos los datos de la Historia Clínica, bajo las normas nacionales (Resolución Numero 008430 de 1993 del Ministerio de Salud) e internacionales que regulan estas actividades en donde no se da a conocer ningún tipo de identificación personal de los que participen en el estudio, manteniendo la privacidad.

Acepto que se me han resuelto todas las dudas y he entendido las explicaciones que me han dado los genetistas del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, teniendo derecho a recibir información actualizada durante el estudio. En caso de causarse algún daño como consecuencia del estudio, el paciente dispondrá de tratamiento e indemnización.

Fecha: _____ Nombre _____ Firma _____
C.C. _____ Dirección y Teléfono _____

Testigo: _____ C.C. _____

Dirección y Teléfono _____

Bibliografía

- Abraham, R., V. Moskvina, et al. (2008). "A genome-wide association study for late-onset Alzheimer's disease using DNA pooling." BMC Med Genomics **1**: 44.
- Alardi, A. M., G. Benard, et al. (2005). "Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release." J Bioenerg Biomembr **37**(4): 207-225.
- Alexander, J. J., A. J. Anderson, et al. (2008). "The complement cascade: Yin-Yang in neuroinflammation--neuro-protection and -degeneration." J Neurochem **107**(5): 1169-1187.
- Alzheimer's Association (2009). "2009 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimers Dement **5**(3): 234-270.
- Alzheimer's Association (2010). "2010 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimers Dement **6**(2): 158-194.
- Andersen, O. M., J. Reiche, et al. (2005). "Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(38): 13461-13466.
- Anderson, C. A., F. H. Pettersson, et al. (2010). "Data quality control in genetic case-control association studies." Nat Protoc **5**(9): 1564-1573.
- Arboleda, G. H., J. J. Yunis, et al. (2001). "Apolipoprotein E genotyping in a sample of Colombian patients with Alzheimer's disease." Neurosci Lett **305**(2): 135-138.
- Baig, S., S. A. Joseph, et al. (2010). "Distribution and expression of picalm in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **69**(10): 1071-1077.
- Beecham, G. W., E. R. Martin, et al. (2009). "Genome-wide association study implicates a chromosome 12 risk locus for late-onset Alzheimer disease." Am J Hum Genet **84**(1): 35-43.
- Bekris, L. M., N. M. Galloway, et al. (2010). "APOE mRNA and protein expression in postmortem brain are modulated by an extended haplotype structure." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **153B**(2): 409-417.
- Bekris, L. M., F. Lutz, et al. (2012). "Functional analysis of APOE locus genetic variation implicates regional enhancers in the regulation of both TOMM40 and APOE." J Hum Genet **57**(1): 18-25.
- Bekris, L. M., S. P. Millard, et al. (2008). "Multiple SNPs within and surrounding the apolipoprotein E gene influence cerebrospinal fluid apolipoprotein E protein levels." J Alzheimers Dis **13**(3): 255-266.
- Bell, R. D., A. P. Sagare, et al. (2007). "Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system." J Cereb Blood Flow Metab **27**(5): 909-918.
- Bergamaschini, L., E. Rossi, et al. (2004). "Peripheral treatment with enoxaparin, a low molecular weight heparin, reduces plaques and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease." J Neurosci **24**(17): 4181-4186.

- Bertram, L., C. Lange, et al. (2008). "Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE." *Am J Hum Genet* **83**(5): 623-632.
- Bertram, L., C. M. Lill, et al. (2010). "The genetics of Alzheimer disease: back to the future." *Neuron* **68**(2): 270-281.
- Bertram, L., M. B. McQueen, et al. (2007). "Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database." *Nat Genet* **39**(1): 17-23.
- Bertram, L. and R. E. Tanzi (2009). "Genome-wide association studies in Alzheimer's disease." *Hum Mol Genet* **18**(R2): R137-145.
- Bettens, K., N. Brouwers, et al. (2008). "SORL1 is genetically associated with increased risk for late-onset Alzheimer disease in the Belgian population." *Hum Mutat* **29**(5): 769-770.
- Botto, M., C. Dell'Agnola, et al. (1998). "Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies." *Nat Genet* **19**(1): 56-59.
- Brodbeck J, M. R., Freedman SB, Weisgraber KH, Mahley RW, Huang Y. (2009). "Apolipoprotein E4 impairs mitochondrial function and increases reactive oxygen species in neuronal cells." *Alzheimers Dement Geriatr Cogn Disord* **5**(4): 307.
- Bushlin, I., R. S. Petralia, et al. (2008). "Clathrin assembly protein AP180 and CALM differentially control axogenesis and dendrite outgrowth in embryonic hippocampal neurons." *J Neurosci* **28**(41): 10257-10271.
- Camelo, D., G. Arboleda, et al. (2004). "Angiotensin-converting enzyme and alpha-2-macroglobulin gene polymorphisms are not associated with Alzheimer's disease in Colombian patients." *J Neurol Sci* **218**(1-2): 47-51.
- Canevari, L. and J. B. Clark (2007). "Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection." *Neurochem Res* **32**(4-5): 739-750.
- Carrasquillo, M. M., O. Belbin, et al. (2010). "Replication of CLU, CR1, and PICALM associations with alzheimer disease." *Arch Neurol* **67**(8): 961-964.
- Carrasquillo MM, B. O., Hunter TA, Ma L, Bisceglia GD, Zou F, Crook JE, Pankratz VS, Sando SB, Aasly JO, Barcikowska M, Wszolek ZK, Dickson DW, Graff-Radford NR, Petersen RC, Morgan K, Younkin SG. (2011). "Replication of BIN1 association with Alzheimer's disease and evaluation of genetic interactions." *J Alzheimers Dis.* **24**(4): 751-758.
- Carrasquillo, M. M., F. Zou, et al. (2009). "Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease." *Nat Genet* **41**(2): 192-198.
- Carter, C. (2011). "Alzheimer's Disease: APP, Gamma Secretase, APOE, CLU, CR1, PICALM, ABCA7, BIN1, CD2AP, CD33, EPHA1, and MS4A2, and Their Relationships with Herpes Simplex, C. Pneumoniae, Other Suspect Pathogens, and the Immune System." *Int J Alzheimers Dis* **2011**: 501862.
- Casley, C. S., L. Canevari, et al. (2002). "Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities." *J Neurochem* **80**(1): 91-100.
- Clarke, G. M., C. A. Anderson, et al. (2011). "Basic statistical analysis in genetic case-control studies." *Nat Protoc* **6**(2): 121-133.

- Cluett, C., C. Brayne, et al. (2010). "Polymorphisms in LMNA and near a SERPINA gene cluster are associated with cognitive function in older people." Neurobiol Aging **31**(9): 1563-1568.
- Coen, K. and W. Annaert (2010). "Presenilins: how much more than gamma-secretase?!" Biochem Soc Trans **38**(6): 1474-1478.
- Coon, K. D., A. J. Myers, et al. (2007). "A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease." J Clin Psychiatry **68**(4): 613-618.
- Corneveaux, J. J., A. J. Myers, et al. (2010). "Association of CR1, CLU and PICALM with Alzheimer's disease in a cohort of clinically characterized and neuropathologically verified individuals." Hum Mol Genet **19**(16): 3295-3301.
- Chang, S., T. ran Ma, et al. (2005). "Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18694-18699.
- De Strooper, B., T. Iwatsubo, et al. (2012). "Presenilins and gamma-Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(1): a006304.
- Deelen, J., M. Beekman, et al. (2011). "Genome-wide association study identifies a single major locus contributing to survival into old age; the APOE locus revisited." Aging Cell **10**(4): 686-698.
- Devi, L., B. M. Prabhu, et al. (2006). "Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction." J Neurosci **26**(35): 9057-9068.
- Dreyling, M. H., J. A. Martinez-Climent, et al. (1996). "The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4804-4809.
- Eberle, F., P. Dubreuil, et al. (1995). "The human PRR2 gene, related to the human poliovirus receptor gene (PVR), is the true homolog of the murine MPH gene." Gene **159**(2): 267-272.
- Ferri, C. P., M. Prince, et al. (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." Lancet **366**(9503): 2112-2117.
- Feulner, T. M., S. M. Laws, et al. (2010). "Examination of the current top candidate genes for AD in a genome-wide association study." Mol Psychiatry **15**(7): 756-766.
- Fiete, D., Y. Mi, et al. (2007). "N-linked oligosaccharides on the low density lipoprotein receptor homolog SorLA/LR11 are modified with terminal GalNAc-4-SO4 in kidney and brain." J Biol Chem **282**(3): 1873-1881.
- Fonseca, M. I., J. Zhou, et al. (2004). "Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease." J Neurosci **24**(29): 6457-6465.
- Forero, D. A., G. Arboleda, et al. (2006). "Association study of polymorphisms in LRP1, tau and 5-HTT genes and Alzheimer's disease in a sample of Colombian patients." J Neural Transm **113**(9): 1253-1262.

- Forero, D. A., B. Benitez, et al. (2006). "Analysis of functional polymorphisms in three synaptic plasticity-related genes (BDNF, COMT AND UCHL1) in Alzheimer's disease in Colombia." *Neurosci Res* **55**(3): 334-341.
- Freitas, E. M., T. C. Phan, et al. (2002). "The poliovirus receptor related 2 (PRR2) and apolipoprotein E genes and coronary heart disease." *J Cardiovasc Risk* **9**(1): 59-65.
- Gabriel SB, S. S., Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. (2002). "The structure of haplotype blocks in the human genome." *Science* **296**(5576): 2225-2229.
- Gandy, S. (2005). "The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease." *J Clin Invest* **115**(5): 1121-1129.
- Grant BD, D. J. (2009). "Pathways and mechanisms of endocytic recycling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 597-608.
- Grupe, A., R. Abraham, et al. (2007). "Evidence for novel susceptibility genes for late-onset Alzheimer's disease from a genome-wide association study of putative functional variants." *Hum Mol Genet* **16**(8): 865-873.
- Guerreiro, R. J., J. Beck, et al. (2010). "Genetic variability in CLU and its association with Alzheimer's disease." *PLoS One* **5**(3): e9510.
- Gulaj, E., K. Pawlak, et al. (2010). "Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients." *Adv Med Sci* **55**(2): 204-211.
- Haft, C. R., M. de la Luz Sierra, et al. (2000). "Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes." *Mol Biol Cell* **11**(12): 4105-4116.
- Hahn, L. W., M. D. Ritchie, et al. (2003). "Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions." *Bioinformatics* **19**(3): 376-382.
- Harel, A., F. Wu, et al. (2008). "Evidence for CALM in directing VAMP2 trafficking." *Traffic* **9**(3): 417-429.
- Harold, D., R. Abraham, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease." *Nat Genet* **41**(10): 1088-1093.
- Hartwell, K. A., B. Muir, et al. (2006). "The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(50): 18969-18974.
- Hauptmann, S., U. Keil, et al. (2006). "Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease." *Exp Gerontol* **41**(7): 668-673.
- Hof, P. R., K. Cox, et al. (1990). "Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex." *J Comp Neurol* **301**(1): 44-54.
- Hollingworth, P., D. Harold, et al. (2011). "Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges." *Int J Geriatr Psychiatry* **26**(8): 793-802.
- Hong, M. G., A. Alexeyenko, et al. (2010). "Genome-wide pathway analysis implicates intracellular transmembrane protein transport in Alzheimer disease." *J Hum Genet* **55**(10): 707-709.

- Huang, Y. (2010). "Mechanisms linking apolipoprotein E isoforms with cardiovascular and neurological diseases." *Curr Opin Lipidol* **21**(4): 337-345.
- InternationalHapMapConsortium (2003). "The International HapMap Project." *Nature* **426**(6968): 789-796.
- Jacquier M, A. D., et al (2001). "APOE epsilon4 and Alzheimer's disease: positive association in a Colombian clinical series and review of the Latin-American studies." *Arg Neuropsiquiatr* **59**(1): 11-17.
- Jones, L., D. Harold, et al. (2010). "Genetic evidence for the involvement of lipid metabolism in Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* **1801**(8): 754-761.
- Jones, S. E. and C. Jomary (2002). "Clusterin." *Int J Biochem Cell Biol* **34**(5): 427-431.
- Kamboh, M. I., R. L. Minster, et al. (2012). "Association of CLU and PICALM variants with Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **33**(3): 518-521.
- Kim, S., S. Swaminathan, et al. (2011). "Genome-wide association study of CSF biomarkers Abeta1-42, t-tau, and p-tau181p in the ADNI cohort." *Neurology* **76**(1): 69-79.
- Kimura, R., M. Yamamoto, et al. (2009). "SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease in a Japanese population." *Neurosci Lett* **461**(2): 177-180.
- Klickstein, L. B., W. W. Wong, et al. (1987). "Human C3b/C4b receptor (CR1). Demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristics of C3/C4 binding proteins." *J Exp Med* **165**(4): 1095-1112.
- Koehler, C. M. (2000). "Protein translocation pathways of the mitochondrion." *FEBS Lett* **476**(1-2): 27-31.
- Lai, E., J. Riley, et al. (1998). "A 4-Mb high-density single nucleotide polymorphism-based map around human APOE." *Genomics* **54**(1): 31-38.
- Lambert, J. C., S. Heath, et al. (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease." *Nat Genet* **41**(10): 1094-1099.
- Laumet, G., V. Chouraki, et al. (2010). "Systematic analysis of candidate genes for Alzheimer's disease in a French, genome-wide association study." *J Alzheimers Dis* **20**(4): 1181-1188.
- Lee, J. H., S. Barral, et al. (2008). "The neuronal sortilin-related receptor gene SORL1 and late-onset Alzheimer's disease." *Curr Neurol Neurosci Rep* **8**(5): 384-391.
- Lee, J. H., R. Cheng, et al. (2011). "Identification of novel loci for Alzheimer disease and replication of CLU, PICALM, and BIN1 in Caribbean Hispanic individuals." *Arch Neurol* **68**(3): 320-328.
- Lee, J. H., R. Cheng, et al. (2007). "The association between genetic variants in SORL1 and Alzheimer disease in an urban, multiethnic, community-based cohort." *Arch Neurol* **64**(4): 501-506.
- Lewis, C. M. (2002). "Genetic association studies: design, analysis and interpretation." *Brief Bioinform* **3**(2): 146-153.
- Li, Y., C. Rowland, et al. (2008). "SORL1 variants and risk of late-onset Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* **29**(2): 293-296.
- LiCC (1967). "Castle's early work on selection and equilibrium." *Am J Hum Genet* **19**: 70-74.
- Liu, F., A. Arias-Vasquez, et al. (2007). "A genomewide screen for late-onset Alzheimer disease in a genetically isolated Dutch population." *Am J Hum Genet* **81**(1): 17-31.

- Logue, M. W., M. Schu, et al. (2011). "A comprehensive genetic association study of Alzheimer disease in African Americans." *Arch Neurol* **68**(12): 1569-1579.
- Lopera F, A. A., Martínez A, et al (1997). "Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation." *JAMA* **12**(10): 739-739.
- Lopez, M., M. Aoubala, et al. (1998). "The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule." *Blood* **92**(12): 4602-4611.
- Lutz MW, C. D., Saunders AM, Roses AD. (2010). "Genetic variation at a single locus and age of onset for Alzheimer's Disease." *Alzheimers Dement*. **6**(2): 125-131.
- Ma, Q. L., D. R. Galasko, et al. (2009). "Reduction of SorLA/LR11, a sorting protein limiting beta-amyloid production, in Alzheimer disease cerebrospinal fluid." *Arch Neurol* **66**(4): 448-457.
- Mahley, R. W. (1988). "Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology." *Science* **240**(4852): 622-630.
- Mahley, R. W. and S. C. Rall, Jr. (2000). "Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **1**: 507-537.
- Mahley, R. W., K. H. Weisgraber, et al. (2006). "Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15): 5644-5651.
- Mao, Y., J. Chen, et al. (2001). "A novel all helix fold of the AP180 amino-terminal domain for phosphoinositide binding and clathrin assembly in synaptic vesicle endocytosis." *Cell* **104**(3): 433-440.
- Martin-Rehrmann, M. D., H. S. Hoe, et al. (2005). "Association of apolipoprotein J-positive beta-amyloid plaques with dystrophic neurites in Alzheimer's disease brain." *Neurotox Res* **7**(3): 231-242.
- Maruszak, A. and C. Zekanowski (2011). "Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **35**(2): 320-330.
- McKhann, G., D. Drachman, et al. (1984). "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." *Neurology* **34**(7): 939-944.
- Meng X, D. A. C. (2012). "Education and dementia in the context of the cognitive reserve hypothesis: a systematic review with meta-analyses and qualitative analyses." *PLoS One* **7**(6): e38268. Epub 32012 Jun 38264.
- Mengel-From, J., K. Christensen, et al. (2011). "Genetic variations in the CLU and PICALM genes are associated with cognitive function in the oldest old." *Neurobiol Aging* **32**(3): 554 e557-511.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." *Nucleic Acids Res* **16**(3): 1215.
- Moore JH, W. S. (2002). "New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension." *ANN Med* **34**(2): 88-95.
- Morgan, K. (2011). "The three new pathways leading to Alzheimer's disease." *Neuropathol Appl Neurobiol* **37**(4): 353-357.
- Musunuru, K. and S. Kathiresan (2008). "HapMap and mapping genes for cardiovascular disease." *Circ Cardiovasc Genet* **1**(1): 66-71.

- Negorev, D., H. Riethman, et al. (1996). "The Bin1 Gene Localizes to Human Chromosome 2q14 by PCR Analysis of Somatic Cell Hybrids and Fluorescence in Situ Hybridization." *Genomics* **33**(2): 329-331.
- Nelson, R. A., Jr. (1953). "The immune-adherence phenomenon; an immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis." *Science* **118**(3077): 733-737.
- Nicot, A.-S., Toussaint, A., Tosch, V., Kretz, C., Wallgren-Petterson, C., Iwarsson, E., Kingston, H., Garnier, J.-M., Biancalana, V., Oldfors, A., Mandel, J.-L., Laporte, J (2007). "Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy." *Nature Genet* **39**: 1134-1139.
- Nielsen, H. M., S. D. Mulder, et al. (2010). "Astrocytic A beta 1-42 uptake is determined by A beta-aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins." *Glia* **58**(10): 1235-1246.
- Offe, K., S. E. Dodson, et al. (2006). "The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments." *J Neurosci* **26**(5): 1596-1603.
- Pfanner, N. and N. Wiedemann (2002). "Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases." *Curr Opin Cell Biol* **14**(4): 400-411.
- Plassman, B. L., K. M. Langa, et al. (2007). "Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study." *Neuroepidemiology* **29**(1-2): 125-132.
- Pradilla AG, P. C., Zúñiga A, Daza JS (1994). "Estudios neuroepidemiológicos colombianos empleando el protocolo de la OMS." *Rev Neurol Arg* **19**: 9-14.
- Pradilla AG, V. A. B., León-Sarmiento FE (2003). "National neuroepidemiological study in Colombia (EPINEURO)." *Rev Panam Salud Publica* **14**(2): 104-111.
- Querfurth, H. W. and F. M. LaFerla (2010). "Alzheimer's disease." *N Engl J Med* **362**(4): 329-344.
- Racaniello, V. R. (1996). "The poliovirus receptor: a hook, or an unzipper?" *Structure* **4**(7): 769-773.
- Rapaport, D. (2005). "How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane?" *J Cell Biol* **171**(3): 419-423.
- Reid, P. C., Y. Urano, et al. (2007). "Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins." *J Cell Mol Med* **11**(3): 383-392.
- Rendall MS, W. M., Favreault MM, Waldron H. (2011). "The protective effect of marriage for survival: a review and update." *Demography* **48**(2): 481-506.
- Ritchie, M. D., L. W. Hahn, et al. (2001). "Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer." *Am J Hum Genet* **69**(1): 138-147.
- Rizzi, F. and S. Bettuzzi (2010). "The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis." *Endocr Relat Cancer* **17**(1): R1-17.
- Robinson, M. S. (1997). "Coats and vesicle budding." *Trends Cell Biol* **7**(3): 99-102.
- Roe CM, X. C., Miller JP, Morris JC. (2007). "Education and Alzheimer disease without dementia: support for the cognitive reserve hypothesis." *Neurology* **68**(3): 223-228.
- Rogaeva, E., Y. Meng, et al. (2007). "The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease." *Nat Genet* **39**(2): 168-177.

- Rogers, J., R. Li, et al. (2006). "Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes." Neurobiol Aging **27**(12): 1733-1739.
- Rohe, M., A. S. Carlo, et al. (2008). "Sortilin-related receptor with A-type repeats (SORLA) affects the amyloid precursor protein-dependent stimulation of ERK signaling and adult neurogenesis." J Biol Chem **283**(21): 14826-14834.
- Roses, A. D. (2010). "An inherited variable poly-T repeat genotype in TOMM40 in Alzheimer disease." Arch Neurol **67**(5): 536-541.
- Roses, A. D., M. W. Lutz, et al. (2010). "A TOMM40 variable-length polymorphism predicts the age of late-onset Alzheimer's disease." Pharmacogenomics J **10**(5): 375-384.
- Sampo, B., S. Kaech, et al. (2003). "Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface." Neuron **37**(4): 611-624.
- Sasaki, K., K. Doh-ura, et al. (2002). "Clusterin/apolipoprotein J is associated with cortical Lewy bodies: immunohistochemical study in cases with alpha-synucleinopathies." Acta Neuropathol **104**(3): 225-230.
- Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." Neurology **43**(8): 1467-1472.
- Scarmeas N, S. Y. (2004). "Cognitive Reserve: Implications for Diagnosis and Prevention of Alzheimer's Disease." Curr Neurol Neurosci Rep **4**(5): 374-380.
- Seaman, M. N. (2005). "Recycle your receptors with retromer." Trends Cell Biol **15**(2): 68-75.
- Seshadri, S., A. L. Fitzpatrick, et al. (2010). "Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease." JAMA **303**(18): 1832-1840.
- Shen, L., S. Kim, et al. (2010). "Whole genome association study of brain-wide imaging phenotypes for identifying quantitative trait loci in MCI and AD: A study of the ADNI cohort." Neuroimage **53**(3): 1051-1063.
- Shibata, N., T. Ohnuma, et al. (2008). "Genetic association between SORL1 polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population." Dement Geriatr Cogn Disord **26**(2): 161-164.
- Shih, S. J., C. Allan, et al. (2000). "Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue." J Biol Chem **275**(41): 31567-31572.
- Sleegers, K., J. C. Lambert, et al. (2010). "The pursuit of susceptibility genes for Alzheimer's disease: progress and prospects." Trends Genet **26**(2): 84-93.
- Smith, B. O., R. L. Mallin, et al. (2002). "Structure of the C3b binding site of CR1 (CD35), the immune adherence receptor." Cell **108**(6): 769-780.
- Spoelgen, R., C. A. von Arnim, et al. (2006). "Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-secretase beta-site APP-cleaving enzyme." J Neurosci **26**(2): 418-428.
- Suh YH, C. F. (2002). "Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease." Pharmacol Rev. **54**(3): 469-525.
- Takei, N., A. Miyashita, et al. (2009). "Genetic association study on in and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese." Genomics **93**(5): 441-448.

- Tan, E. K., J. Lee, et al. (2009). "SORL1 haplotypes modulate risk of Alzheimer's disease in Chinese." Neurobiol Aging **30**(7): 1048-1051.
- Tanzi, R. E. and L. Bertram (2005). "Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective." Cell **120**(4): 545-555.
- Tebar, F., S. K. Bohlander, et al. (1999). "Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic." Mol Biol Cell **10**(8): 2687-2702.
- Thambisetty, M., A. Simmons, et al. (2010). "Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease." Arch Gen Psychiatry **67**(7): 739-748.
- Tucker AM, S. Y. (2011). "Cognitive reserve in aging." Curr Alzheimer Res **8**(4): 354-360
- Waite, L. J. (1995). "Does marriage matter?" Demography **32**: 483-507.
- Wechsler-Reya, R., D. Sakamuro, et al. (1997). "Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing." J Biol Chem **272**(50): 31453-31458.
- Weis, J. H., C. C. Morton, et al. (1987). "A complement receptor locus: genes encoding C3b/C4b receptor and C3d/Epstein-Barr virus receptor map to 1q32." J Immunol **138**(1): 312-315.
- Weisgraber, K. H., S. C. Rall, Jr., et al. (1981). "Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms." J Biol Chem **256**(17): 9077-9083.
- Widner, B., F. Leblhuber, et al. (2000). "Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease." J Neural Transm **107**(3): 343-353.
- Wijsman, E. M., N. D. Pankratz, et al. (2011). "Genome-wide association of familial late-onset Alzheimer's disease replicates BIN1 and CLU and nominates CUGBP2 in interaction with APOE." PLoS Genet **7**(2): e1001308.
- Wittke-Thompson, J. K., A. Pluzhnikov, et al. (2005). "Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium." Am J Hum Genet **76**(6): 967-986.
- Wong, P., D. Taillefer, et al. (1994). "Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration." Eur J Biochem **221**(3): 917-925.
- Xie, Z., M. E. Harris-White, et al. (2005). "Apolipoprotein J (clusterin) activates rodent microglia in vivo and in vitro." J Neurochem **93**(4): 1038-1046.
- Yerbury, J. J., S. Poon, et al. (2007). "The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures." FASEB J **21**(10): 2312-2322.
- Younkin, S. G. (1995). "Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease." Ann Neurol **37**(3): 287-288.
- Yu, C. E., H. Seltman, et al. (2007). "Comprehensive analysis of APOE and selected proximate markers for late-onset Alzheimer's disease: patterns of linkage disequilibrium and disease/marker association." Genomics **89**(6): 655-665.

Bibliografia

- Yu, J. T., L. Li, et al. (2010). "Implication of CLU gene polymorphisms in Chinese patients with Alzheimer's disease." Clin Chim Acta **411**(19-20): 1516-1519.
- Zheng, P., L. A. Pennacchio, et al. (2004). "Identification of a novel enhancer of brain expression near the apoE gene cluster by comparative genomics." Biochim Biophys Acta **1676**(1): 41-50.