



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Análisis de Polimorfismos en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE en pacientes con enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico en Antioquia (2011-2013)

Mónica María Castañeda Cediell

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias
Bogotá, Colombia

2013

Análisis de Polimorfismos en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE en pacientes con enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico en Antioquia (2011-2013)

Mónica María Castañeda Cediell

Bióloga, Universidad Nacional de Colombia

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Neurociencias

Director:

Rodrigo Pardo Turriago MD, MSc Epidemiólogo, Neurólogo. Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Carlos Andrés Villegas Lanau MD, MSc, PhD Universidad de Antioquia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias

Bogotá, Colombia

2013

*“Somos nuestra memoria, somos ese
quimérico museo de formas inconstantes,
ese montón de espejos rotos”*

JL Borges

Agradecimientos

A mis tutores por su apoyo.

A la Universidad Nacional de Colombia por la financiación de esta investigación por medio de su convocatoria de apoyo a posgrados.

A la Universidad de Antioquia, por recibirme como un estudiante más de sus programas de posgrado y de manera particular al coordinador del grupo Genética Molecular GenMol, profesor Gabriel Bedoya, en cuyo laboratorio realicé la parte experimental de este trabajo y compartí una buena parte de mi tiempo de formación y al coordinador del Grupo de Neurociencias de Antioquia, profesor Francisco Lopera quien con su apoyo decidido fue pilar fundamental para la realización de este trabajo. A mis amigos, compañeros y colegas de ambos grupos por las productivas discusiones, asesorías y voz de apoyo en momentos difíciles de este proceso.

A los pacientes con enfermedad de Alzheimer y sus familias, cuya generosidad para con el estudio de la enfermedad en Antioquia no deja de asombrarme, conmoverme y me genera admiración y respeto.

A mi mamá, María Antonia Cediel, sin cuyo apoyo moral y económico este trabajo no podría haberse hecho realidad.

Resumen

Este es un estudio preliminar de tipo exploratorio por factibilidad en el cual se genotipificaron, en el período comprendido entre el 2011 y 2013, 10 polimorfismos en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE en pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico e individuos control, pertenecientes a la región de Antioquia, teniendo en cuenta una hipótesis funcional en la cual, variaciones en estos genes, relacionados con el procesamiento y aclaramiento de la proteína precursora amiloide (APP, *amyloid precursor protein*) podrían estar relacionados con la susceptibilidad frente a la enfermedad.

Se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en pacientes con enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico e individuos control y se determinaron los OR para cada uno. El análisis de asociación alélica permite determinar un OR de 2.09 (CI 1.20-3.62, p 0.0083) para el alelo C del marcador rs514049 de ADAM10 y un OR de 6.29 (CI 3.09-12.82, p 4.4×10^{-5}) para el alelo C del marcador rs429358 de APOE. En el análisis de asociación genotípica se determinó un OR de 0.45 (CI 0.22-0.94, p 0.031) para el heterocigoto C/G del marcador rs638405 en el gen BACE1. El análisis de haplotipos permite determinar que para el gen APOE (haplotipo formado por los marcadores rs405509, rs429358 y rs7412) el ATC presenta un OR de 0.48 (CI 0.28-0.83) y el ACC presenta un OR de 5.5 (CI 2.57-11.87), eventos que deben ser confirmados en una muestra con mayor poder.

Palabras clave: Enfermedades neurodegenerativas; Enfermedad de Alzheimer; polimorfismos de nucleótido simple; ADAM10; BACE1; NCSTN; APOE; Enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío.

Abstract

This is a feasibility preliminar study on sporadic patients with Alzheimer disease and healthy controls from Antioquia. They were genotyped, between 2011 and 2013, for 10 SNPs in the ADAM10, BACE1, NCSTN and APOE genes. Based upon functional hypothesis, i.e. that variation in genes that process and clean Amyloid Precursor Protein (APP) could be related to susceptibility to AD, we obtain allelic and genotypic frequencies and OR for each one.

This analysis produces an OR of 2.09 (CI 1.20-3.62, p 0.0083) for rs514049 (C allele) from ADAM10, OR of 6.29 (CI 3.09-12.82, p 4.4×10^{-5}) for rs429358 (C allele) from APOE, an OR of 0.45 (CI 0.22-0.94, p 0.031) for rs638405 (C/G) from BACE1. Two haplotypes (ATC and ACC) from rs405509, rs429358 and rs7412 polymorphisms at APOE have an OR of 0.48 (CI 0.28-0.83) (ATC) and an OR of 5.5 (CI 2.57-11.87) (ACC). However this results should be studied in a bigger sample with power enough to produce conclusive results.

Keywords: Neurodegenerative diseases; Alzheimer's disease; single nucleotide polymorphism (SNP); ADAM10; BACE1; NCSTN; APOE; Alzheimer disease, Late Onset

Contenido

Pág.

Resumen	VII
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	1
1. Aspectos teóricos	5
1.1 Generalidades	7
1.1.1 Criterios diagnósticos	7
1.1.2 Prevalencia	9
▪ Años de vida con discapacidad	9
1.1.3 Factores de riesgo	10
▪ Historia familiar	10
▪ Alelos de APOE	10
▪ Deterioro cognitivo leve (DCL)	10
▪ Enfermedad cardiovascular y/o cerebrovascular	11
▪ Hipertensión	11
▪ Diabetes tipo II	12
▪ Peso Corporal	12
▪ Niveles plasmáticos de lípidos	12
▪ Consumo de cigarrillo	12

1.1.4	Factores protectores	13
▪	Reserva cognitiva	13
▪	Alimentación	13
▪	Actividad física.....	14
▪	Compromiso social y cognitivo	14
1.1.5	Genética epidemiológica	14
▪	Enfermedad de Alzheimer Familiar	14
▪	Enfermedad de Alzheimer Esporádico	15
1.2	Sistemas celulares implicados	16
1.3	Formación de placas neuríticas: eventos asociados	17
1.3.1	Producción del péptido beta amiloide	17
▪	Vía no amiloidogénica	18
▪	Vía Amiloidogénica	20
1.3.2	Aclaramiento del péptido beta amiloide	22
1.4	Genes implicados en el procesamiento de la proteína precursora amiloide....	24
1.4.1	ADAM10	24
▪	Polimorfismos de nucleótido simple	24
1.4.2	BACE1	26
▪	Polimorfismos de nucleótido simple	26
1.4.3	NCSTN	27
▪	Polimorfismos de nucleótido simple	27
1.4.4	APOE	29
▪	Polimorfismos de nucleótido simple	30
1.5	Estudios de ligamiento y de asociación	30
1.5.1	Estudio de haplotipos	33
1.5.2	Estudio de asociación en genoma amplio	33
1.5.3	Estudio de asociación en genoma amplio en la enfermedad de Alzheimer	34
1.6	1000 genomas	35

1.7	Contexto nacional	36
2.	Objetivos.....	39
2.1	Objetivo general	41
2.1	Objetivos específicos	41
3.	Metodología	43
3.1	Tipo de estudio	45
3.2	Universo de estudio	45
3.3	Selección de la muestra: Criterios de inclusión y exclusión	45
3.4	Definición de variables	47
3.5	Selección de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs)	47
3.6	Obtención de ADN	47
3.7	Cuantificación y preparación de platos	48
3.8	Diseño de primers	48
3.9	Selección de enzimas de restricción	49
3.10	PCR – RFLP	49
3.10.1	Amplificación de marcadores	49
3.10.2	Digestión	49
3.11	PCR competitiva alelo específica	50
3.12	Análisis estadísticos	50
4.	Resultados y discusión.....	51
	▪ Población de estudio	53
	▪ Polimorfismos evaluados	58
	▪ Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg	58
	▪ Frecuencias alélicas	60
	▪ Frecuencias genotípicas	63

▪ Estudio de asociación	66
▪ Determinación de haplotipos	69
5. Conclusiones y recomendaciones.....	73
6. Limitaciones, aportes y perspectivas	73
Anexos	73
A. Criterios para el diagnóstico clínico de Enfermedad de Alzheimer	83
B. Tipos comunes de demencia y sus principales características	85
C. Cambios neuropatológicos en la Enfermedad de Alzheimer	87
D. CIE-10. Clasificación estadística Internacional de enfermedades	89
E. Formato de consentimiento informado para participar en el estudio	91
F. Concepto del comité de ética de la Sede de Investigación Universitaria	97
G. Concepto ético, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia ...	103
H. Diseño de primers	109
I. Enzimas de restricción	111
J. Amplificación de marcadores	113
K. Amplicones y fragmentos de restricción	114
L. Genotipificación por KASP™	115
M. Descriptores	117
N. Equilibrio de Hardy-Weinberg	121
O. Frecuencias alélicas	123

P. Frecuencias genotípicas	125
Q. Pruebas de asociación	127
R. Determinación de haplotipos	131
Bibliografía	135

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1: Tasa de incidencia anual para la enfermedad de Alzheimer	9
Figura 1.2: Vías de procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP)	18
Figura 1.3: Vía no amiloidogénica	19
Figura 1.4: Vía amiloidogénica	20
Figura 1.5: Sitios de corte de las secretasas	21
Figura 1.6: Esquema de la proteína ApoE humana	23
Figura 1.7: Estructura genómica de NCSTN y determinación de haplotipos	28
Figura 1.8: Estructura de LD (Haploview) para los marcadores estudiados	70

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1: Estudios de ligamiento para la Enfermedad de Alzheimer.....	31
Tabla 2: Estudios de Asociación en genoma amplio	35
Tabla 3: Criterios de inclusión	46
Tabla 4: Criterios de exclusión	46
Tabla 5: Datos demográficos de la población de estudio	53
Tabla 6: Presencia/Ausencia del alelo $\epsilon 4$ de APOE y desempeño en MMSE	57
Tabla 7: Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) evaluados	58
Tabla 8: Comparación de frecuencias alélicas en diferentes poblaciones	61
Tabla 9: Datos de la distribución de alelos de APOE	63
Tabla 10: Comparación de las frecuencias genotípicas	64
Tabla 11: Datos de la distribución de genotipos de APOE	65
Tabla 12: Comparación de análisis de asociación alélica	67

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
α secretasa	Alfa secretasa
sAPP α	Alfa APP soluble
β Amiloide	Beta amiloide
β secretasa	Beta secretasa
sAPP β	Beta APP soluble
γ secretasa	Gama secretasa
$\epsilon 2, \epsilon 3, \epsilon 4$	Alelos 2, 3 y 4 de APOE
μ l	microlitros
τ	Tau

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
bp	Pares de bases	
kDa	Kilodaltons	1×10^3
ng	Nanogramos	1×10^{-9}

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Acido desoxirribonucleico
AGEs	<i>Advanced glycosylation end products</i> Subproductos de glicosilación avanzada
AICD	<i>APP intracellular domain</i> Dominio intracelular de la Proteína precursora amiloide
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> Proteína precursora amiloide
ARN	Acido ribonucleico
CIE-10	Clasificación Internacional de Enfermedades, décima versión
DALYs	<i>Disability Adjusted Life Years</i> Años de vida ajustados por discapacidad
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> Manual Estadístico y diagnóstico de Enfermedades mentales
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> Factor de crecimiento epidermal
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
EOAD	<i>Early Onset Alzheimer's disease</i> Enfermedad de Alzheimer de comienzo temprano
FAD	<i>Familial Alzheimer's Disease</i> Enfermedad de Alzheimer familiar
GWAS	<i>Genome wide association Studies</i> Estudios de asociación de genoma amplio
HapMap	<i>Haplotype map</i> Mapa de haplotipos

Abreviatura	Término
IDE	<i>Insulin degrading enzyme</i> Enzima degradadora de insulina
IL	<i>Interleukin</i> Interleucinas 1 A, 1 β , 6
KASP	<i>Kompetitive Allele Specific PCR</i> PCR competitiva alelo específica
LD	<i>Linkage disequilibrium</i> Desequilibrio de ligamiento
LOAD	<i>Late Onset Alzheimer's disease</i> Enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío
LRP	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i> Proteína relacionada con el receptor de Lipoproteínas de baja densidad
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i> Deterioro Cognitivo Leve (DCL)
NIA	<i>National Institute of Aging</i> Instituto Nacional de envejecimiento
NINCDS-ADRDA	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association</i> Instituto Nacional de Enfermedades neurológicas comunicables y accidentes cerebrovasculares y la Asociación de Enfermedad de Alzheimer y enfermedades relacionadas
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> Centro nacional para la información biotecnológica
PCR-RFLP	Polymerase chain reaction – Restriction fragment length polymorphism Reacción en cadena de la polimerasa – Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RAGEs	<i>Advanced glycosylation end products receptor</i> Receptor de subproductos de glicosilación avanzada
RIP	<i>Regulated intramembrane proteolysis</i> Proteólisis intramembranal regulada
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> Especies reactivas de oxígeno
SAD	<i>Sporadic Alzheimer's disease</i> Enfermedad de Alzheimer esporádica
SISNE	Sistema de información neurológica
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> Polimorfismo de nucleótido simple
SSCP	Single-strand conformation polymorphism Polimorfismo de conformación de cadena sencilla
TLR	<i>Toll-like receptors</i> Receptores tipo Toll
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> Factor de necrosis tumoral alfa
VLDLR	Very low density lipoprotein receptor Receptor de lipoproteínas de muy baja densidad
VNTRs	<i>Variable number tandem repeats</i> Repeticiones en tandem de número variable

Introducción

La enfermedad de Alzheimer, desorden neurodegenerativo cuyo factor de riesgo principal es la edad, es una de las formas de demencia más común en el mundo; al aumentar la expectativa de vida, un número mayor de individuos podría estar afectado. En el mundo existían 36 millones de personas con demencia en el 2010 y esta cifra podría llegar a los 115 millones en el año 2050 (WHO, 2006; Libre Rodríguez, 2008; ADI, 2009, ADI, 2012). Actualmente un 58% de pacientes con demencia vive en países de ingresos bajos y medio-bajos y se estima que para el 2050 un 71% de los pacientes con demencia estarán ubicados en éstos (WHO, 2006; Prince, 2007; Kalaria, 2008; ADI, 2009). Por otra parte, en el mundo, menos de una persona de cada cuatro recibe un diagnóstico formal, lo cual redundaría en un menor acceso al cuidado, tratamiento y soporte para estas personas (ADI, 2012) La demencia, por los costos formales en atención para los sistemas de salud e informales para los familiares, genera un impacto social y económico importante, debiéndose constituir en una prioridad para los sistemas públicos de salud (Ferri, 2005; WHO, 2006; ADI, 2009;WHO, 2012).

En países de ingresos altos, la enfermedad de Alzheimer junto con otros tipos de demencia se presenta como la cuarta causa de muerte, si bien en países como Colombia aparece listada como la vigésimo sexta. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>,<http://www.healthmetricsandevaluation.org/gbd/visualizations/gbd-2010-leading-causes-and-risks-region-heat-map>)

La clasificación de la Enfermedad de Alzheimer permite distinguir entre pacientes con agregación familiar, los cuales se caracterizan por mutaciones en genes causativos (APP, *amyloid precursor protein*), Presenilina 1 y Presenilina 2), inicio precoz y un patrón de herencia autosómico dominante y pacientes que son los únicos casos de su grupo familiar y no presentan mutaciones en estos genes, denominados pacientes de tipo esporádico. Cifras recientes refieren que los casos familiares explican entre el 1 y 2% de todos los casos reportados (Skotte, 2010; Guerreiro, 2012), los demás son pacientes de

tipo esporádico. Si bien se reconoce actualmente que estos últimos pueden estar influenciados por factores genéticos (Bertram, 2012)

Los marcadores histopatológicos de la enfermedad son las placas seniles, formadas principalmente por el depósito de péptido beta (β) amiloide y los ovillos neurofibrilares compuestos por la proteína tau (τ) hiperfosforilada. La hipótesis de la cascada amiloide (Hardy, 1992; Hardy, 2009) implica el procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP, *amyloid precursor protein*), mediante enzimas denominadas secretasas (ADAM10, BACE1 y el complejo γ secretasa del cual hacen parte Presenilina 1 y NCSTN) que cortan la APP produciendo o no el péptido β amiloide. Adicionalmente, el único factor de riesgo genético aceptado a la fecha es el alelo 4 de la Apolipoproteína E (APOE), proteína que a nivel celular media el aclaramiento del péptido β amiloide (Deane, 2008; Bu, 2009).

A partir de la publicación del primer borrador del genoma humano, la determinación del mapa de haplotipos humano (por el proyecto HapMap), la realización de estudios de asociación de genoma amplio (GWAS, *genome wide association studies*) y la publicación del análisis de variaciones en 1000 genomas, ha sido posible determinar que muchas variaciones (polimorfismos) en la secuencia de ADN podrían estar relacionadas con la susceptibilidad de los individuos frente a distintas enfermedades.

La hipótesis de trabajo, (teniendo en cuenta las variaciones en el genoma que conferirían susceptibilidad a la enfermedad), es que el estudio de polimorfismos en la secuencia de ADN que codifica para proteínas asociadas con el procesamiento o aclaramiento del péptido β amiloide, podría generar una explicación celular y molecular de la formación de placas, el desarrollo de la enfermedad y permitiría plantear blancos terapéuticos.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue analizar polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, *single nucleotide polymorphism*) en genes que codifican para enzimas que procesan el APP o median el aclaramiento del péptido β amiloide en pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico de la región de Antioquia. Se emplearon las técnicas de PCR – RFLP y KASP para la genotipificación, se determinaron frecuencias alélicas y genotípicas y se compararon con un grupo control de individuos también proveniente de esta región. Dado que Antioquia ha sido caracterizada por algunos autores como una región con aislamiento genético se postula como un excelente

candidato para este tipo de estudio y adicionalmente cubre vacíos de información existente al respecto en la región.

Una de las principales limitaciones del estudio está dada por el tamaño muestral, debido a la dificultad para conseguir pacientes y controles con los criterios de inclusión/exclusión empleados.

1. Aspectos teóricos

1.1 Generalidades

El envejecimiento de la población a partir del aumento en la expectativa de vida, que se incrementó desde 1900 hasta nuestros días ha sido asociado, tanto en países industrializados como en desarrollo, con un aumento en la aparición de enfermedades crónicas tales como diabetes, cáncer, desórdenes cardíacos y neurológicos (Fontana, 2009), de los cuales la Enfermedad de Alzheimer es el más común (Wan, 2008; Wang X., 2008; Avramopoulos, 2009; Kern, 2009), representando del 50 al 70% de todos los casos de demencias (Mattsson, 2009; Ravid, 2009; Wan, 2009).

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza clínicamente por el deterioro progresivo de la memoria y otros dominios cognitivos, al punto de interferir con las actividades de la vida cotidiana, con un promedio de duración de 8-10 años (Sloane, 2002; Serretti, 2007; Wang X., 2008; Avramopoulos, 2009). Otras publicaciones respaldan este intervalo, pues refieren una duración de aproximadamente 7.1 años (Fitzpatrick, 2005 en WHO & ADI, 2012). Fue descrita en 1906 por Alois Alzheimer, quien describió el caso clínico y reportó, luego de la muerte de la paciente, las placas seniles (neuríticas) y los ovillos fibrilares (Hardy, 2006) que se constituyen en el hallazgo neuropatológico asociado a la enfermedad (Braak, 1991; Jellinger, 2000; Avramopoulos, 2009; Nelson, 2009; Ravid, 2009).

1.1.1 Criterios diagnósticos

Los criterios clínicos para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer fueron definidos en 1984 por la Asociación Americana de Alzheimer y el Instituto Nacional para los desórdenes neurológicos y accidentes cerebrovasculares (NINCDS-ADRDA) en una publicación realizada por McKhann y colaboradores en la cual se mencionaba la aparición insidiosa, así como deterioro progresivo de memoria y otras funciones cognitivas. De tal manera que el diagnóstico, basado en estos criterios podía referirse a un probable, posible o definitivo caso de enfermedad de Alzheimer (McKhann, 1984) (Anexo A)

En el 2011, el Instituto Nacional de Envejecimiento de los Estados Unidos (NIA, *National Institute of Aging*) en conjunto con la Asociación de Alzheimer revisó los criterios

diagnósticos y propuso nuevos criterios y lineamientos que pudieran ser lo suficientemente flexibles y asequibles al personal de salud sin acceso a pruebas neuropsicológicas, imágenes cerebrales y medición de biomarcadores (los que reflejan la acumulación del péptido β amiloide y los que reflejan el daño neuronal (McKhann, 2011a)) en líquido cefalorraquídeo, así como para investigadores en ensayos clínicos con acceso a estas tecnologías. En estos lineamientos se conserva el diagnóstico de probable y se mantiene el término de posible pero redefinido para estar mejor enfocado (McKhann, 2011). Adicionalmente, en la publicación del 2011 se determinan criterios para demencia de diversas causas y se propone la siguiente terminología para la demencia causada por la Enfermedad de Alzheimer: Demencia por enfermedad de Alzheimer probable, Demencia por enfermedad de Alzheimer posible y Demencia por enfermedad de Alzheimer probable o posible con evidencia del proceso patofisiológico de la enfermedad. Si bien los dos primeros términos se determinan para ser empleados en la clínica, el tercero se usaría con propósitos de investigación (McKhann, 2011). Por otra parte cabe destacar que algunas condiciones pueden presentar síntomas que simulan una demencia pero son reversibles con tratamiento adecuado. Se calcula que el 9% de individuos tienen demencia potencialmente reversible causada por depresión, delirio, efectos secundarios de medicamentos, problemas de tiroides, deficiencia de vitaminas o uso excesivo de alcohol. En contraste, la enfermedad de Alzheimer, así como otras demencias (Anexo B) es causada por daño neuronal que no puede ser revertido con los tratamientos actuales (Thies, 2013).

En el 2012 el NIA (*National Institute of Aging*) junto con la Asociación de Alzheimer propone una revisión de los lineamientos de 1997 respecto a los criterios para la evaluación neuropatológica, con el fin de describir y categorizar los cambios cerebrales asociados con la enfermedad de Alzheimer y otras demencias y realizar una mejor correlación clínico-patológica (Anexo C) (Hyman, 2012, Thies, 2013).

Actualmente ha sido posible determinar que los cambios cerebrales de la enfermedad comienzan varios años antes de la aparición de síntomas asociados a la pérdida de memoria, de tal manera que se plantean tres etapas de la enfermedad: el estadio preclínico, el Deterioro cognitivo leve (DCL o MCI, *mild cognitive impairment*), que ha recibido atención desde finales de la década de los noventa y en el cual se presentan pequeños cambios en el desempeño cognitivo, y el sintomático, es decir, demencia debida a la enfermedad de Alzheimer (McKhann, 2011, McKhann, 2011 a, Thies, 2013)

1.1.2 Prevalencia

Estudios sobre prevalencia de las demencias reportan 24 millones de personas afectadas para el año 2005, de las cuales el 70% correspondería a individuos con Enfermedad de Alzheimer, con un incremento anual de cuatro millones y medio de casos (Ferri, 2005 en Reitz, 2011; Mayeux, 2012). Si bien la prevalencia de la demencia es muy alta en Norteamérica (con 6.4% de la población de 60 años), Latinoamérica ostenta el tercer puesto con 4.9% (Mayeux, 2012).

Las tasas de incidencia anual (por 1000 individuos) son 10.5 y 9.2 para Norteamérica y Latinoamérica respectivamente, incrementándose exponencialmente con la edad, especialmente después de la séptima década de vida (Mayeux, 2012) Figura 1.1. Otros estimativos determinan un 3.79 por mil en el mundo de la enfermedad de Alzheimer para el año 2005, incrementándose a un 5.56 por mil para el 2030. Para Colombia, que según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud pertenece al grupo Amr-B (países de América con baja mortalidad infantil y baja mortalidad en adultos), la prevalencia estimada sería de 3.37 para el 2005, elevándose a 6.04 para el 2030 (WHO, 2006; Prince, 2007).

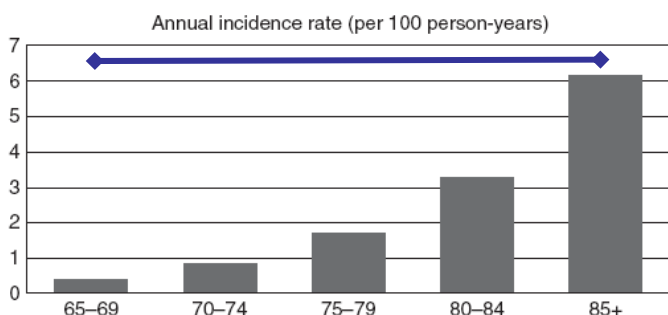


Figura 1.1: Tasa de incidencia anual (por 100 personas-años) para la Enfermedad de Alzheimer. Estimado a partir de los datos de 24 estudios publicados al respecto. (Modificado de Mayeux, 2012)

- **Años de vida con discapacidad**

Tal como refieren algunos estudios epidemiológicos, la demencia contribuye con 11.2% de los años de vida con discapacidad en personas de 60 años o más y por los costos formales en atención para los sistemas de salud e informales para los familiares, genera un impacto social y económico importante (Ferri, 2005; WHO, 2006, ADI, 2009). Colombia, en el grupo Amr-B y que según los datos del Banco Mundial pertenece al grupo de ingresos medio-bajos, está en el grupo con mayor número de años de vida perdidos por discapacidad o DALYs (*Disability Adjusted Life Years*) causados por

enfermedades, en relación con el nivel de ingresos. Los datos muestran además un incremento global proyectado del 66% en DALYs del año 2005 al 2030 para la enfermedad de Alzheimer y otras demencias (WHO, 2006).

1.1.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo son antecedentes de parte de los mecanismos de la enfermedad y pueden ser asociados con la etiología o el desenlace de la misma. Estos factores permiten evaluar el riesgo pero no son lo suficientemente sensibles para constituirse en marcadores diagnósticos (Reitz, 2011). Existen varios factores de riesgo, de los cuales uno de los más importantes es la edad; ya que la enfermedad de Alzheimer no hace parte del proceso normal de envejecimiento (Thies, 2013). Para la determinación de dichos factores se han empleado dos tipos de aproximaciones analíticas: los estudios observacionales (casos y controles, cohortes y transversales) y los experimentales (como los ensayos clínicos) (Reitz, 2011).

- Historia familiar

Los individuos con al menos un familiar en primer grado con Enfermedad de Alzheimer tienden a presentar una propensión mayor que aquellos sin familiares con la enfermedad y dicho riesgo aumenta con el número de familiares afectados (Lautenschlager, 1996 Mayeux, 1991 en Thies, 2013).

- Alelos de APOE

Este gen codifica una proteína que transporta el colesterol en el torrente sanguíneo. Cada individuo hereda un alelo de sus padres y existen tres alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. El más común es la forma $\epsilon 3$ y no está asociado al incremento o descenso en el riesgo, las formas $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$ son menos comunes y mientras el $\epsilon 2$ disminuye el riesgo, la presencia de al menos un alelo $\epsilon 4$ aumenta el riesgo de presentar la enfermedad y modular su edad de inicio, sin embargo, heredar estos alelos no garantiza que el individuo desarrolle la enfermedad, tal como ocurre con otros factores genéticos (Thies, 2013).

- Deterioro cognitivo leve (DCL)

El DCL o MCI (*Mild cognitive impairment*) es una condición que no es una fase normal del envejecimiento (Albert, 2011) e implica cambios medibles en las funciones cognitivas

y que pueden ser percibidas por el individuo o sus familiares, pero que no afecta sus habilidades para las actividades básicas de la vida cotidiana. Los individuos con DCL que afecta la memoria son más propensos a desarrollar una demencia que aquellos que no lo presentan, sin embargo estos individuos pueden retornar a sus niveles cognitivos previos o permanecer estables sin desarrollar demencia (Thies, 2013).

- Enfermedad cardiovascular y/o cerebrovascular

Existe creciente evidencia que sugiere un vínculo entre la salud cardiovascular y la cerebrovascular. Adicionalmente los factores de riesgo para ésta se constituyen en factores de riesgo para la demencia y la enfermedad de Alzheimer, y a diferencia de los factores genéticos, la mayor parte de estos factores son condiciones modificables con un adecuado estilo de vida (Thies, 2013).

Por otra parte, los cambios cerebrovasculares (infartos hemorrágicos, infartos corticales isquémicos, vasculopatías y cambios en la sustancia blanca entre otros) incrementan el riesgo de demencia. El mecanismo por el cual los accidentes cerebrovasculares producen el deterioro cognitivo incluye la destrucción del parénquima cerebral con atrofia, el daño en sitios estratégicos que contribuyen a los procesos de memoria y el incremento de los depósitos de β amiloide debidos a la hipoperfusión de sectores del cerebro y la sobreexpresión de proteínas como la p25 y cdk5 que incrementan el nivel de BACE1, la cual a su turno incrementa el procesamiento amiloidogénico de la APP (Reitz, 2011; Mayeux, 2012).

- Hipertensión

En individuos entre 40 y 60 años, el aumento en la presión arterial incrementa el riesgo de deterioro cognitivo, demencia y enfermedad de Alzheimer. Como la hipertensión disminuye la integridad vascular de la barrera hematoencefálica, produce extravasación de proteínas que ocasionarían daño celular, reducción de la función sináptica, apoptosis e incremento de la acumulación de β amiloide, generando como resultado el deterioro cognitivo (Reitz, 2011). A la fecha se han realizado estudios clínicos aleatorizados cuyos resultados son inconsistentes respecto al uso de medicamentos antihipertensivos y su utilidad frente al riesgo de demencia o en el curso del deterioro cognitivo (Reitz, 2011).

- Diabetes tipo II

Estudios observacionales han permitido determinar que la diabetes tipo II incrementa casi al doble el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Se ha sugerido que afecta la acumulación del péptido β amiloide pues la hiperinsulinemia que caracteriza esta enfermedad hace que la insulina compita por la enzima degradadora de insulina (IDE, *insulin degrading enzyme*), la cual esta asociada al aclaramiento del péptido. Adicionalmente, el deterioro en la tolerancia a la glucosa genera la formación de subproductos de glicosilación (AGE, *Advanced glycosylation end products*) y las placas y ovillos contienen receptores para los AGEs (RAGEs) (Reitz, 2011, Mayeux, 2012)

- Peso corporal

Los estudios que han examinado la distribución de grasa corporal indican que un índice de masa corporal bajo está asociado a la disfunción cognitiva. Más aún, estudios posteriores demuestran que ambos, un bajo o muy alto peso corporal tienen relación con el riesgo para la enfermedad de Alzheimer, aunque esta relación parece depender de la edad a la cual este índice es medido. Por otra parte la pérdida de peso antes de la aparición de la demencia podría estar relacionada con el prodromo de la enfermedad (Reitz, 2011; Mayeux, 2012).

- Niveles plasmáticos de lípidos

Existen datos conflictivos respecto a la relación entre la dislipidemia y el deterioro cognitivo o la enfermedad de Alzheimer. Cuando se disminuye el colesterol presente en la membrana plasmática se inhibe el clivaje de APP disminuyendo los péptidos 1-40 y 1-42 del amiloide, sin embargo, la dislipidemia aumenta el riesgo de enfermedad vascular que conllevaría a deterioro cognitivo. Los estudios realizados a la fecha respecto al manejo de la dislipidemia con estatinas no han generado suficiente evidencia de su impacto en el riesgo para la enfermedad de Alzheimer (Reitz, 2011)

- Consumo de cigarrillo

La relación entre el consumo de cigarrillo y la enfermedad de Alzheimer es incierta, dado que los estudios han producido resultados conflictivos. Sin embargo el fumar podría afectar el riesgo de varias maneras entre las que se encuentra la generación de radicales

libres y producción de estrés oxidativo, el efecto sobre el sistema inmune adicional a que el consumo de cigarrillo promueve la enfermedad cerebrovascular, factor de riesgo conocido para el deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer. Por otra parte, la nicotina por si misma incrementa la liberación de acetilcolina, eleva el número de receptores nicotínicos y aumenta la atención y procesamiento de la información (Reitz, 2011; Mayeux, 2012), lo que estaría en contravía de la producción de estrés oxidativo.

Otros factores de riesgo determinados para la enfermedad de Alzheimer son la depresión, los traumas encefalocraneanos y el estrés psicológico (Reitz, 2011).

1.1.4 Factores protectores

- Reserva cognitiva

Los individuos con un estilo de vida intelectualmente enriquecido, como aquellos con un alto nivel educativo u ocupacional tienen un riesgo reducido de presentar la enfermedad de Alzheimer. Así como aquellos individuos con actividades placenteras en el tiempo libre calificadas como intelectuales tales como leer, participar en juegos, asistir a clases, tocar algún instrumento, o actividades físicas como la jardinería, practicar un deporte, bailar y participar en actividades comunitarias. Los estudios realizados sugieren que los mismos factores relacionados con la educación, que retrasarían el inicio de la demencia permiten a estos individuos afrontar más efectivamente los cambios cerebrales asociados al envejecimiento. Sin embargo, en estos individuos el curso de la enfermedad es más corto y el desenlace suele producirse más pronto (Mayeux, 2012).

- Alimentación

Los lípidos asociados con la dieta aumentan los niveles circulantes de colesterol, lo que a su vez incrementa el riesgo vascular en el cerebro y el riesgo para la enfermedad de Alzheimer. La ingesta de grasas saturadas ha sido asociada con un aumento en el riesgo, por el contrario, el consumir altas cantidades de grasas n-6-poliinsaturadas o monoinsaturadas reduce el riesgo (Morris, 2003 en Mayeux, 2012). De igual manera se ha encontrado que el consumo de altas cantidades de vitamina D disminuye el riesgo. Dado que algunos estudios muestran resultados contradictorios respecto a la ingesta de algunos elementos, se ha postulado que la dieta mediterránea, caracterizada por una alta ingesta de vegetales, legumbres, frutas y cereales, así como ácidos grasos insaturados

(en forma de aceite de oliva), consumo de pescado y bajo consumo de carne y pollo y cantidades regulares pero moderadas de alcohol (vino), produciría una alta adherencia y un bajo riesgo para la enfermedad de Alzheimer (Scarmeas, 2009 en Mayeux, 2012)

- **Actividad física**

La práctica de ejercicio aumenta el aprendizaje tanto en animales jóvenes como en aquellos más viejos, activando los mecanismos de plasticidad que remodelan los circuitos cerebrales (Cotman, 2002 en Mayeux, 2012). Adicionalmente promueve la vascularización cerebral y estimula la neurogénesis. En adultos mayores sin problemas cognitivos el ejercicio aeróbico fue asociado a un mejor funcionamiento cognitivo.

- **Compromiso social y cognitivo**

Los individuos con un mayor compromiso social y cognitivo, tal como se mencionó anteriormente, tienen un riesgo menor de presentar déficit cognitivo que evolucione a enfermedad de Alzheimer (Wilson, 2002, 2007, Verghese, 2003 y Akbaraly, 2009 en Mayeux, 2012).

1.1.5 Genética epidemiológica

La enfermedad de Alzheimer se clasifica según la edad de inicio, denominándose temprana cuando los pacientes presentan el cuadro de deterioro cognitivo antes de los 60 años, (*EOAD, Early Onset Alzheimer's Disease*), y de inicio tardío (*LOAD, Late Onset Alzheimer's Disease*) cuando es posterior a esta edad (Bertram, 2010). Estudios realizados por Schottky en 1932, Van Bogaert en 1940 y Essen-Moller en 1946 en familias con la enfermedad (Hardy, 2006) permitieron posteriormente, no sólo determinar genes causativos, sino también discriminar entre dos tipos de pacientes, los familiares y los esporádicos.

- **Enfermedad de Alzheimer Familiar**

Los pacientes de tipo familiar (*FAD, Familial Alzheimer's Disease*) presentan mutaciones en alguno de estos tres genes: la Proteína precursora de Amiloide (*APP, amyloid precursor protein*) localizada en el cromosoma 21, Presenilina 1 localizada en el cromosoma 14 y Presenilina 2 localizada en el cromosoma 1.

Se ha determinado que el patrón de herencia de estas mutaciones suele ser autosómico dominante, con una alta penetrancia. A la fecha, en el gen de la APP se han reportado cuarenta mutaciones de las cuales algunas son duplicaciones cromosómicas, otras seis mutaciones son de naturaleza no patogénica (no asociadas con la presentación de la enfermedad), una mutación cuya naturaleza patogénica no es clara y otras dos cuyo patrón de herencia parecería ser recesivo (Cruts, 2012, Guerreiro, 2012). Recientemente, en este gen fue reportada una mutación denominada protectora pues reduce en un 40% la producción de péptidos amiloidogénicos *in vitro* (Jonsson, 2012).

En el gen de Presenilina 1 hay 197 mutaciones reportadas, de las cuales ocho son de naturaleza patogénica incierta (no presentan fenotipo neurodegenerativo), ocho deleciones, dos inserciones y cuatro mutaciones no patogénicas; y en el gen de Presenilina 2 aparecen 25 mutaciones reportadas, de las cuales siete son de naturaleza patogénica incierta y cinco son no patogénicas (Tanzi, 2005; Brouwers, 2008; Bertram, 2010; Bettens, 2010; <http://www.molgen.ua.ac.be/adMutations/>; Bertram, 2012; Cruts, 2012).

Estas mutaciones generan un incremento en los niveles del péptido β amiloide e inicio temprano de la enfermedad. Dado que las mutaciones en estos genes explican un porcentaje muy bajo de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, se cree que existe un porcentaje de variación genética que permanece oculta.

- Enfermedad de Alzheimer Esporádico

La mayoría de pacientes son de tipo esporádico, razón por la cual existe una búsqueda intensiva de genes candidatos que pudieran estar relacionados con la enfermedad. Según reportes hechos por Bertram, de 700 genes que han sido estudiados en los últimos 30 años como posibles candidatos, sólo unos pocos muestran efecto de riesgo significativo frente a la enfermedad (Bertram, 2008).

Actualmente, el único gen que ha podido ser asociado como factor de riesgo para la enfermedad y su efecto ha sido replicado en diferentes estudios en varias poblaciones es el gen de la Apolipoproteína E (APOE), localizado en el cromosoma 19. Como se mencionó anteriormente, este gen tiene tres alelos: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ de los cuales el alelo $\epsilon 4$ incrementa el riesgo de aparición y modula la edad de inicio en forma dependiente de la

dosis (un alelo $\epsilon 4$ cuadruplica el riesgo, mientras que dos alelos lo aumentan diez veces) (Strittmatter, 1993; Corder, 1993; Guerreiro, 2012; Tanzi, 2012; Bettens, 2013).

1.2 Sistemas celulares implicados

Tal como se mencionó inicialmente, los marcadores histopatológicos de la enfermedad son las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares. Las placas neuríticas están compuestas por agregados insolubles de péptido β amiloide de 8 a 10 nanómetros y los ovillos neurofibrilares están compuestos por filamentos helicoidales pareados de proteína tau hiperfosforilada (Selkoe, 2001; Masters, 2006a y 2006b; Bettens, 2010; Querfurth, 2010).

Sin embargo, el contexto celular de la enfermedad implica alteración en varios sistemas adicionales: la pérdida de sinapsis en el hipocampo y el neocórtex como un evento temprano en la progresión de la enfermedad y el mejor correlato estructural de la disfunción cognitiva (Arendt, 2009); la alteración selectiva de los mecanismos de plasticidad neuronal y potenciación a largo plazo asociados con los procesos de memoria (Haass, 2007; Deshpande, 2009); la disfunción mitocondrial y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) con el consecuente estrés oxidativo que se manifiesta en la oxidación y nitración de proteínas, oxidación de DNA y RNA, peroxidación de lípidos de membrana y formación de subproductos de glicación avanzada (AGE) (Varadarajan, 2000; Butterfield, 2002); la activación anormal de astrocitos y microglia que desencadenan un aumento en la respuesta inflamatoria mediada por receptores tipo Toll (*Toll-like receptor* TLR) y citoquinas como las interleuquinas IL-1A, IL-1 β e IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y proteínas de fase aguda (Wan, 2008; Wang B., 2008; Kim, 2009) entre otros.

El compuesto que subyace a todas estas alteraciones es el mismo componente de las placas seniles: el péptido β amiloide, el cual ha sido determinado como punto de partida de todas las anomalías celulares, tal como lo refiere la hipótesis de la cascada amiloidea (Hardy, 1992; Hardy, 2002), que postula el desbalance entre la producción y el aclaramiento del péptido β amiloide como el origen del proceso neurodegenerativo (Bettens, 2010) y que ha sido revisada (Hardy, 2009) y complementada posteriormente con la hipótesis de la vía dual en la cual, además de éste, existen mecanismos

independientes pero paralelos para la hiperfosforilación de la proteína tau y consecuente neurodegeneración (Small, 2008).

Teniendo en cuenta la hipótesis de la cascada amiloide, es el péptido β amiloide de 40 o 42 aminoácidos el que sufre cambios conformacionales que facilitan su insolubilización, agregación y depósito para formar las placas, lo cual desencadena el posterior proceso neurodegenerativo y demás alteraciones celulares y moleculares.

1.3 Formación de placas neuríticas: eventos asociados

1.3.1 Producción del péptido β amiloide

La proteína precursora de amiloide (APP, *Amyloid precursor protein*) hace parte de un grupo de proteínas relacionadas entre las que se encuentran APLP1 y APLP2 en mamíferos y APPL en *Drosophila* (O'Brien, 2011). En humanos está localizada en el cromosoma 21, comprende 18 exones a lo largo de 290 kilobases; de éstos, los exones 16 y 17 codifican el péptido β amiloide. Esta proteína sufre splicing alternativo para producir ocho isoformas, siendo tres las más comunes (APP₆₉₅, 751 y 770); de éstas la APP₆₉₅ se expresa preferencialmente en neuronas. Es una proteína transmembranal tipo I con un dominio C terminal citosólico y una región mayor N terminal (Kang, 1987; O'Brien, 2011).

El péptido β amiloide es producido en condiciones normales en el metabolismo celular por un mecanismo fisiológico conocido como la proteólisis intramembranal regulada (RIP, *regulated intramembrane proteolysis*) (Haass, 2007); en éste, la proteína precursora amiloide libera su ectodominio por medio de proteasas conocidas como secretasas o "sheddasas" al espacio extracelular. El fragmento anclado en la membrana se cliva al interior de su dominio transmembranal liberando el péptido hidrofóbico al espacio extracelular, y el dominio intracelular al citoplasma para cumplir funciones específicas.

Figura 1.2

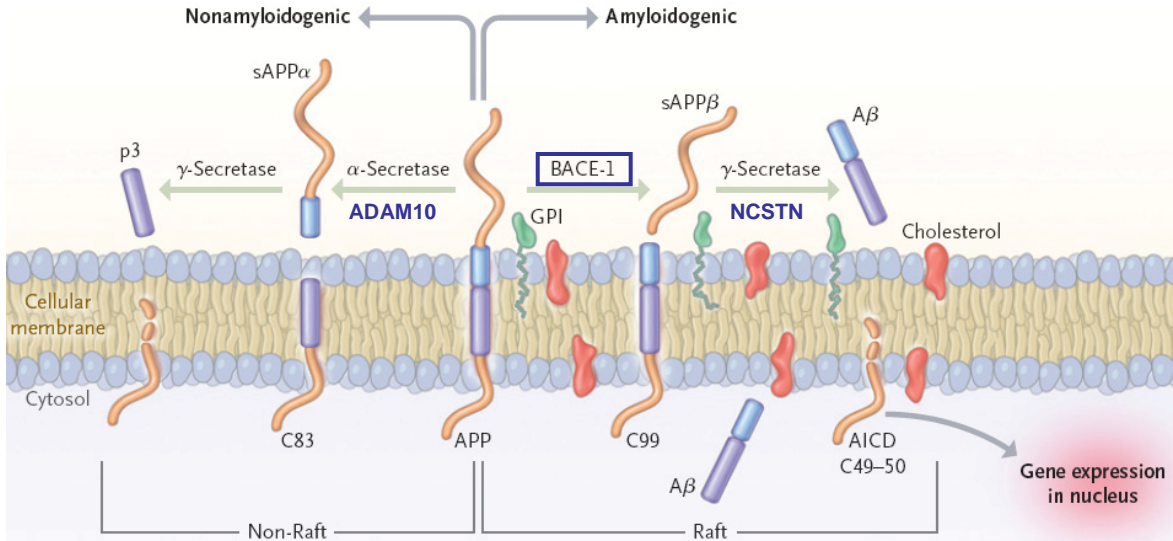


Figura 1.2: Vías de procesamiento de la proteína precursora amiloide. El corte por la α secretasa (ADAM10) inicia el procesamiento por la vía no amiloideogénica, liberando el ectodominio de la proteína precursora amiloide (sAPP α) y dejando el residuo carboxi terminal C83, el cual es digerido por la γ secretasa. Luego de esto se libera el fragmento extracelular p3 y el dominio intracelular amiloide (AICD). El procesamiento amiloideogénico se inicia por la β secretasa (BACE1) liberando un fragmento sAPP β más corto. El fragmento restante, denominado C99 es sustrato de la γ secretasa y genera el péptido β amiloide (A β) y el dominio intracelular AICD. El corte de la γ secretasa ocurre al interior de la membrana celular. Los fragmentos sAPP α y sAPP β son generados después del clivaje por una α o β secretasa (Modificado de Querfurth, 2010)

- Vía no amiloideogénica

Las dos vías de procesamiento de la APP son mutuamente excluyentes, en la vía constitutiva o no amiloideogénica actúa una α secretasa constituida por uno o más miembros de la familia de metaloproteasas ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*), de la cual hace parte ADAM10. Esta proteína tipo I está localizada en el cromosoma 15 y comprende 160kb, se encuentra anclada a la membrana actuando como un zimógeno y puede estar en forma inactiva en Golgi; (Endres, 2010). Su función puede ser regular la adhesión celular, migración, desarrollo y señalización; como tal posee varios dominios: un prodominio que actúa como una chaperona molecular para permitir la expresión del sitio catalítico, un dominio catalítico desintegrina rico en cisteína, una región transmembranal y una cola citoplasmática. Tiene varios sustratos entre los que se encuentran Notch, el factor de crecimiento epidermal (EGF), Efrinas, cadherinas y APP (Lammich, 1999; Moss, 2007). ADAM10, actuando como α secretasa, corta la proteína precursora de amiloide entre los aminoácidos 16(K) y 17(L) del péptido β amiloide, evita su producción y genera un fragmento extracelular de APP soluble (sAPP α) de 105 a 125 kDa y un fragmento C terminal transmembranal (CTF α) de 10 kDa que es procesado por

la γ secretasa para generar el péptido P3 de 3 kDa. Figura 1.3 (Lammich, 1999; Turner, 2004; Haass, 2007; Brouwers, 2008; Marks, 2008; de Strooper, 2010; Querfurth, 2010).

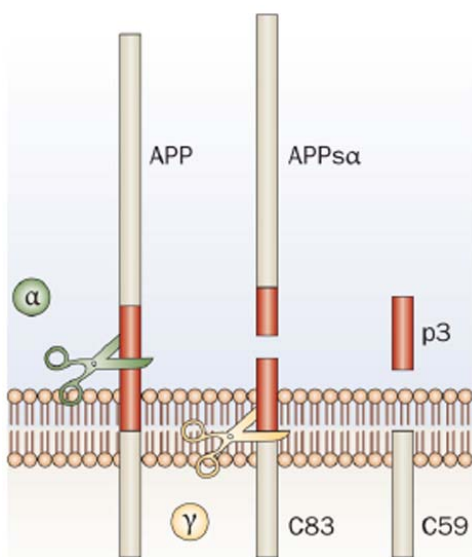


Figura 1.3: Procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). Vía no amiloidogénica. Corte de APP por una α secretasa en la secuencia del péptido β amiloide, lo cual libera el fragmento extracelular de APP soluble ($sAPP\alpha$). Un corte posterior por la γ secretasa libera el fragmento P3 (modificado de De Strooper, 2010)

La sobreexpresión de ADAM10 en cultivos celulares aumenta el $sAPP\alpha$ y el fragmento de 10kDa disminuyendo la producción de β amiloide; su inhibición por mutaciones en la zona de unión al zinc disminuye la actividad α secretasa. Adicionalmente, los ratones transgénicos con la delección para el gen que codifica ADAM10 presentan letalidad o defectos en el desarrollo de sistema nervioso central y señalización de Notch entre otros (Marks, 2008; Reiss, 2009), pero ratones que son modelo para la Enfermedad de Alzheimer, al cruzarse con ratones transgénicos para ADAM10 muestran una atenuación de la patología de placas y producción aumentada de la vía α secretasa (Endres, 2010). Estudios recientes refieren además que la sobreproducción de Sirtuina (una deacetilasa NAD dependiente) en el modelo del ratón doble transgénico para Alzheimer (mutación sueca en APP/delección del exón 9 en PS1) activa la transcripción de ADAM10, reduce la patología cerebral y déficit comportamental en el ratón, lo cual se comprueba en el ratón knock out de Sirtuina pues estos rasgos aumentan (Donmez, 2010).

- Vía Amiloidogénica

En la vía amiloidogénica, particularmente frecuente en neuronas, se produce el péptido β amiloide completo (Brouwers, 2008) Figura 1.4 (de Strooper, 2010). En ésta, la β secretasa o BACE1 (*β -site APP Cleaving Enzyme*), identificada como una proteína transmembranal tipo I de 501 aminoácidos, con actividad aspartil proteasa (de Strooper, 2000 en Eehalt, 2003) está codificada en el cromosoma 11. BACE1 es sintetizada como un zimógeno (con un prodominio corto) en el retículo endoplasmático y luego de la remoción del péptido de señal sufre un clivaje del prodominio por una convertasa similar a furina para ser glicosilada en cuatro residuos asparragina, generando la BACE1 madura de 70kDa (Hunt, 2009; Vassar, 2009; Willem, 2009), la cual es enviada a través de la vía secretora a la membrana plasmática agrupándose en los “lipid rafts” ricos en colesterol en los cuales ocurre el procesamiento de APP (Eehalt, 2003; Haass, 2004), o puede ser internalizada a los endosomas, de pH ácido, el cual es óptimo para su acción (Cole, 2008; Hunt, 2009). Esta enzima corta la APP en el residuo aspartil 1 para generar el extremo N terminal del β amiloide y un fragmento C terminal anclado a la membrana denominado C99.

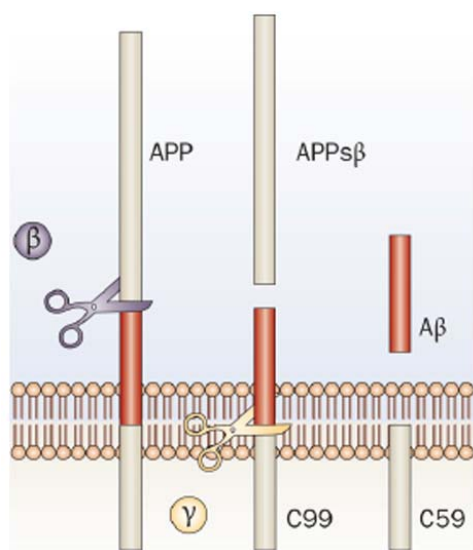


Figura 1.4: Procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). Vía amiloidogénica. La β secretasa corta el APP en el fragmento N terminal del péptido β amiloide, liberando el ectodominio sAPP β . El procesamiento por la γ secretasa por el extremo carboxi terminal libera el péptido β amiloide (Modificado de De Strooper, 2010)

Este corte de BACE1 es prerequisite para el clivaje del fragmento C99 mediado por la γ secretasa, generando el dominio intracelular de APP (AICD) de 49-50 aminoácidos, el cual se transloca al núcleo para cumplir funciones específicas en la regulación de la expresión génica. Figura 1.4 (Haass, 2004; Cole, 2008; Vassar, 2009; de Strooper, 2010; Querfurth, 2010).

La γ secretasa es un complejo aspartil proteasa intramembranal compuesto por cuatro proteínas: Presenilina 1 (o 2) que forma el centro del complejo con dos residuos aspartato catalíticamente activos que están localizados en los dominios transmembranales 6 y 7; Nicastrina, una proteína transmembranal tipo I de aproximadamente 150kDa cuando está completamente glicosilada, posee un dominio hidrofílico conservado en el cual mutaciones sin sentido incrementan la producción de β amiloide, mientras que la delección del mismo la inhiben (Dermaut, 2002, Kimberly, 2003).

La región transmembranal de Nicastrina interactúa con el fragmento C terminal de 37 aminoácidos de Presenilina para formar el complejo γ secretasa (Kaether, 2004). Nicastrina ha sido además reportada como la receptora del sustrato a clivar (Shah, 2005); APH1 (*anterior pharynx-defective 1*) y PEN2 (*Presenilin enhancer protein 2*) que son altamente hidrofóbicas y estarían involucradas en la maduración y estabilidad del complejo γ secretasa (Haass, 2004 y 2007; Small, 2006; Selkoe, 2007; Steiner, 2008; de Strooper, 2010).

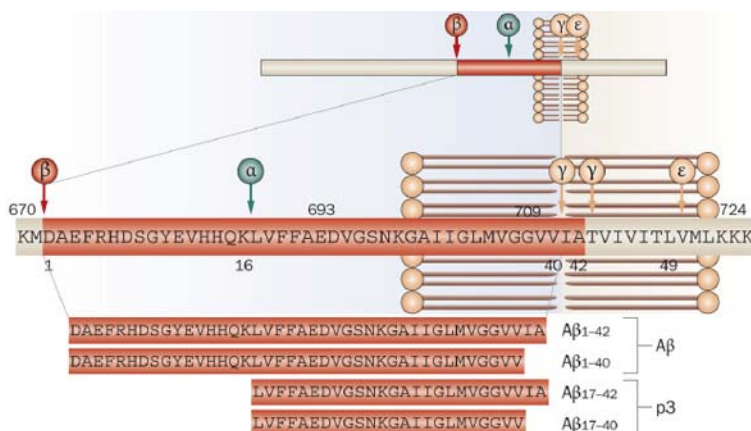


Figura 1.5: Procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). Sitios de corte de las diferentes secretasas y los fragmentos producidos. Péptido β amiloide de 40 o 42 aminoácidos y péptido p3 (Modificado de De Strooper, 2010)

Es importante destacar que este complejo media el corte de varios sustratos, hecho que debe ser tenido en cuenta en estudios de disminución o aumento en la expresión de dichas proteínas como blanco terapéutico para la Enfermedad de Alzheimer.

1.3.2 Aclaramiento del péptido beta amiloide

La acumulación del péptido β amiloide está determinada por un estado de equilibrio dinámico entre la tasa de producción, el aclaramiento, degradación, oligomerización y depósito del mismo. Respecto al aclaramiento, éste se lleva a cabo por dos vías: la degradación proteolítica y el transporte desde el cerebro mediada por receptores (Tanzi, 2004; Turner, 2004). La degradación proteolítica se lleva a cabo por medio de varias enzimas entre las cuales se encuentran tres metalopeptidasas de zinc: la enzima degradadora de insulina (IDE, *insulin-degrading enzyme*) o *insulysin*, *Nepriylsin* (NEP) y la enzima convertidora de angiotensina (ACE, *Angiotensin I-converting enzyme*) (Miners, 2010); dos inhibidores de proteasas: alfa 2 macroglobulina (α 2M, *Alpha-2-Macroglobulin*) y alfa 1 antiqumotripsina (α 1ACT, *Alpha-1-antichymotrypsin*) también conocida como SERPINA3.

La otra vía por la cual se produce el aclaramiento del péptido β amiloide es el transporte desde el cerebro, la cual está mediada por LRP (*low density lipoprotein receptor-related protein*) a través de APOE y RAGE (*receptor of advanced glycation end-products*), que son receptores multiligando de la superficie celular que favorecen el aclaramiento de varias proteínas (Tanzi, 2004).

La Apolipoproteína E (APOE) es un polipéptido de 299 aminoácidos con una masa de 34kDa y con dominios de hélice alfa para la unión reversible de lípidos (Hatters, 2006; Bu, 2009). Las isoformas están determinadas de la siguiente manera: ApoE2 posee cisteína en las posiciones 112 y 158 siendo la isoforma mas estable conformacionalmente y tiene baja afinidad por el receptor de LDL; ApoE3 tiene cisteína en la posición 112 y arginina en la 158 con estabilidad media, alta afinidad por el receptor de LDL e intermediarios de plegamiento y ApoE4 con arginina en ambas posiciones, conformación menos estable (lo cual hace que presente conformación no plegada y sea mas sensible a proteólisis), alta afinidad por el receptor de LDL e intermediarios de plegamiento (Hatters, 2006), lo cual tiene implicaciones funcionales. Es sintetizada en diferentes tejidos (principalmente en el hígado, aunque en sistema nervioso se encuentra en astrocitos) y parece estar asociada a la reparación luego de una lesión; es una proteína plasmática que sirve como ligando de los receptores de lipoproteínas de baja densidad y a través de esta interacción, participa en el transporte de colesterol y otros lípidos (Weisgraber, 1981; Mahley, 1984, Mahley, 1988).

En cultivos de neuronas de ganglio de la raíz dorsal se observó que la isoforma apoE3 incrementa el crecimiento de las neuritas, mientras que la apoE4 lo disminuye (Nathan, 1994, en Chou, 2005). En experimentos con ratones deficientes de ApoE y ratones transgénicos para las isoformas humanas E3 y E4 se mostró que la isoforma E4 favorece la nucleación y agregación de amiloide y mayores marcadores de daño oxidativo en el sistema cardiovascular y el cerebro (los ratones que carecen de ApoE), adicionalmente estos ratones presentan un número reducido de terminales presinápticas (con y sin expresión de APP humana) e incremento en cantidad de placas (cuando se expresa APP humana) (Hatters, 2006; Mahley, 2006). Por otra parte, ApoE tiene dos dominios estructurales, en el fragmento N terminal presenta un dominio de 22kDa para el sitio de unión al receptor de LDL (residuos 136-150) y en el C terminal presenta un dominio de 10kDa con el sitio de unión a lípidos (residuos 244-272); en la isoforma E4 se presenta una interacción entre una arginina en la posición 61 y el ácido glutámico en la 255, lo cual explicaría algunos efectos detrimentales de esta isoforma Figura 1.6 (Mahley, 2006; Bu, 2009).

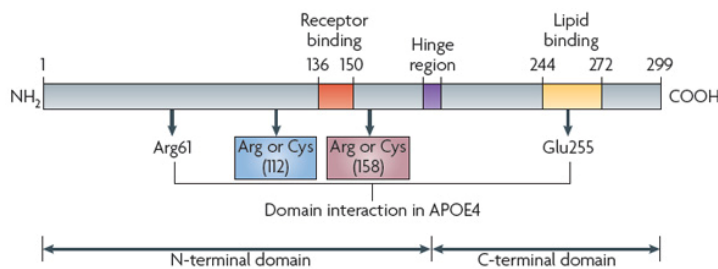


Figura 1.6: Esquema de la ApoE humana con un dominio amino terminal que incluye la región de unión al receptor y un dominio carboxi terminal que contiene la región de unión a lípidos. Se señalan los residuos que le confieren heterogeneidad a las isoformas y la región de interacción entre Arg 61 y Glutámico 255. (Modificado de Bu, 2009)

En un trabajo publicado por Deane en el 2008 se muestra como en el modelo murino, el aclaramiento del péptido β amiloide a través de la barrera hematoencefálica funciona de manera dependiente de la isoforma de ApoE; cuando la isoforma E4 se une al amiloide redirecciona el aclaramiento del LRP1 (*LDL receptor-related protein 1*) al receptor VLDL (*VLDLR, very low density lipoprotein receptor*), el cual internaliza ApoE4 y el complejo con amiloide más lentamente que LRP1, mientras que las isoformas E2 y E3 permiten un aclaramiento más rápido del amiloide (Deane, 2008; Bu, 2009). ApoE promueve además la degradación del péptido amiloide mediada por Neprilysin e IDE, siendo este proceso más efectivo en la isoforma E3 respecto a la E4 (Jiang, 2008; Bu, 2009, Kim, 2009).

1.4 Genes implicados en el procesamiento de la proteína precursora amiloide

1.4.1 ADAM10

El gen ADAM10 (OMIM 602192) (*ADAM metallopeptidase domain 10*) también conocido como kuz, AD10 o MADM, se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 15 (15q21.3) en humanos y tiene su homólogo en el cromosoma 9 de ratones. Comprende 16 exones a lo largo de 160kb y codifica la proteína *Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 precursor* o de manera corta ADAM10, compuesta por 748 aminoácidos (84142 Daltons) y es una proteína de membrana tipo I (Prinzen, 2005).

Esta proteína fue identificada en 1995 por Wolfsberg y colaboradores (Prinzen, 2005) y fue purificada a partir de membranas de monocitos humanos por Rosendahl y colaboradores en 1997.

- Polimorfismos de nucleótido simple

Un estudio pionero, realizado en el 2003 y teniendo en cuenta que ADAM10 usa la proteína priónica PrPc como sustrato, determina la relación entre el SNP rs972801 (en desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo funcional) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, sin encontrar asociación entre dicho polimorfismo y la susceptibilidad para ésta (Plamont, 2003). En el 2005, Prinzen y colaboradores publican un estudio sobre la estructura genómica y la caracterización funcional del promotor de ADAM10, los dos polimorfismos estudiados corresponden a la posición -630 (ahora conocido como rs514049) que resulta en un cambio de G por T y la posición -279 (hoy denominado rs653765) que resulta en un cambio de A por G. Adicionalmente encuentran otros dos polimorfismos mediante SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) y secuenciamiento. Sin embargo, no encuentran asociación con la enfermedad (Prinzen, 2005). En un estudio de genoma amplio realizado en el 2008, Li y colaboradores analizaron entre otros el polimorfismo rs17269348 sin hallar evidencia de asociación (Li, 2008).

En el 2009, Harold y colaboradores realizaron el estudio de genoma amplio (GWAS) más grande para esa fecha, con 16000 individuos, encontrando asociación con los genes CLU y PICALM, replicando la asociación encontrada para APOE y determinando una tendencia para el polimorfismo rs17269348 (OR=1.28) (Harold, 2009) (www.alzgene.org).

Por otra parte, en un estudio basado en familias, Kim en el 2009 evaluó nueve SNPs entre los que se encuentran: rs2305421, rs514049, rs605928 y rs4775096. De estos, se analizaron los polimorfismos rs605928 y rs4775096 en un estudio de genoma amplio que incluía estas familias y en el cual se incluyó el rs17269348. Los hallazgos relevantes del estudio de Kim reportan dos mutaciones, la Q170H y la R181G, con penetrancia incompleta (Kim, 2009). Sin embargo, Cai y colaboradores publican un estudio en pacientes esporádicos en el cual encuentran tres variaciones raras con cambio de sentido, una de ellas (L9V) en 5 pacientes y ningún control; estos pacientes pertenecen al grupo Ashkenazi por sus marcadores de ancestría y ésta es la razón de la variación encontrada más que una relación con la enfermedad. A diferencia de la publicación de Kim en el 2009, Cai determina que para este gen las mutaciones no juegan un papel significativo sobre el riesgo para la enfermedad de Alzheimer y llama la atención sobre un estudio cuidadoso de los marcadores de ancestría de las muestras incluidas en las investigaciones, pues las variantes raras, encontradas en grupos poblacionales específicos, podrían generar resultados que no son reproducibles en poblaciones de diferente componente ancestral (Cai, 2012).

Se sabe que el gen que codifica para la proteína lipasa C se encuentra la misma región cromosómica que ADAM10 y que adicionalmente juega un papel importante en el metabolismo de lípidos, de tal manera que en 2010 Laws y colaboradores realizan un análisis de polimorfismos que incluye el SNP rs653765, sin encontrar asociación con la enfermedad de Alzheimer (Laws, 2010)

En una publicación del 2011, Laws y colaboradores evalúan 27 polimorfismos en ADAM10, entre los que se encuentra el rs653765 y concluyen que no existe asociación con la enfermedad para ningún SNP o haplotipo (Laws, 2011).

Dos publicaciones recientes refieren una asociación significativa entre el polimorfismo rs514049 ubicado en el promotor del gen y los niveles de APP α . En la primera de ellas se encontró que los controles con genotipo CC tienen mayores niveles de APP α respecto a los otros genotipos y se presenta el efecto opuesto en los pacientes con Alzheimer (Bekris, 2011). En la segunda publicación, Bekris y colaboradores determinan que la presencia del haplotipo C-A formado por los SNPs rs514049 y rs653765 está asociada con mayores niveles de la fracción soluble de APP α (sAPP α) en líquido cefalorraquídeo

de individuos normales comparados con pacientes y mayores niveles de la proteína ADAM10 en hipocampo (pero no en cerebelo) de sujetos con menor número de placas comparados con individuos con más placas, lo cual sugiere que la expresión de ADAM10 está modulada por la presencia de este haplotipo y es dependiente de la región cerebral estudiada (Bekris, 2012).

1.4.2 BACE1

El gen BACE1 (OMIM 604252) (*beta-site APP-cleaving enzyme 1*), también conocido como ASP2 o HSPC104 se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 11 (11q23.3), en una región implicada con la Enfermedad de Alzheimer en un estudio de ligamiento (Tanzi, 2005). Tiene su homólogo en el cromosoma 9 de ratones y comprende 9 exones a lo largo de 30kb. Codifica la proteína beta secretasa (*beta-secretase 1*) y produce al menos 4 isoformas por splicing alternativo de las cuales la más común es una proteína de 501 aminoácidos y 55711 Daltons. Fue clonada e identificada de manera independiente por varios grupos de investigación en 1999 (Vassar, 2009).

- Polimorfismos de nucleótido simple

Un estudio realizado por Murphy y colaboradores en el 2001 permitió la determinación de la estructura genómica de BACE1 y la caracterización de dos polimorfismos, uno en el exón 5 y el otro en el intrón 5, sin embargo, no fue posible determinar asociación con la enfermedad (Murphy, 2001). En el mismo año, Allison Goate y su grupo secuenciaron ambos genes (BACE1 y BACE2) en pacientes con demencia frontotemporal y enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano y tardío, determinando un efecto leve del polimorfismo en el exón 5 en individuos portadores del alelo $\epsilon 4$ de APOE (Nowotny, 2001)

En el año 2003, Jordi Clarimón estudia tres polimorfismos en población española y encuentra asociación entre el genotipo GG del polimorfismo del exón 5 y la enfermedad, si bien el riesgo encontrado (OR 2.2) indica para el autor que no son factores de riesgo mayores (Clarimón, 2003). En el año 2004, se reporta el estudio de polimorfismos en BACE1 en población asiática (dos cohortes de chinos Han) y se encuentra que la frecuencia del alelo C para el polimorfismo C/G del exón 5 es mayor a la reportada para

población caucásica y que el genotipo CC de éste se encuentra asociado con la enfermedad (Shi, 2004)

El equipo de Cai en el 2005 realiza un estudio en el polimorfismo del exón 5 en pacientes con enfermedad de Alzheimer pertenecientes a la población de chinos Han y encuentra que las diferencias en frecuencias alélicas y genotípicas no es significativa, sin embargo, al estratificar por el alelo $\epsilon 4$ de APOE encuentra que el alelo G está asociado a riesgo (Cai, 2005).

En el 2012, Calero y colaboradores encuentran que el polimorfismo en el exón 5 es un factor de riesgo en pacientes con enfermedad de Creutzfeldt-Jakob de inicio temprano que son homocigotos para la mutación M129M de PRNP (*Prion protein*) (Calero, 2012)

1.4.3 NCSTN

El gen NCSTN, (OMIM 605254) (NICASTRIN) también conocido como APH2, se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q23.2) en humanos, en una región de ligamiento para la enfermedad (Dermaut, 2002) y tiene su homólogo en el cromosoma 1 de ratones. Esta compuesto por 17 exones y codifica un ORF de 709 aminoácidos.

- Polimorfismos de nucleótido simple

En el 2002, Dermaut y su grupo realizaron un análisis de este gen que les permitió detectar 14 polimorfismos (237G/A, -69C/G, -74C/T, 636 A/G, +18C/G, 747C/T, +61G/A, +32C/G, -5C/G, 1249 A/T, -129T/C, +31INSG, -119G/C, -74C/T), 10 de ellos intrónicos, 3 mutaciones silentes y una mutación sin sentido que parece no ser patogénica, Figura 1.7. En una muestra de pacientes con inicio temprano y tardío encontraron un haplotipo (denominado hap B) cuya frecuencia fue mayor en el grupo de inicio temprano respecto a los pacientes de comienzo tardío y los controles. La frecuencia de este haplotipo fue mayor en individuos sin alelo $\epsilon 4$ de APOE con un OR de 4.1, lo cual indica el papel de la disfunción del complejo γ secretasa en pacientes de inicio temprano (Dermaut, 2002). En el mismo año, Orlacchio y colaboradores analizaron dos polimorfismos (237 G/A y 747C/T) en la región codificante de NCSTN en una muestra de población italiana, sin obtener evidencia de asociación (Orlacchio, 2002)

Confaloni y su grupo analizaron este gen en el 2003 encontrando las siguientes variantes 636A/G (L212L en el exón 6), 747 C/T (D249D en el exón 7), +18C/G en el intrón 6, +13T/C en el intrón 9, -5C/G en el intrón 10 y una variante en el 3'UTR (2514T/C), tres de ellas formando un haplotipo, sin embargo, no pudo confirmar una mayor frecuencia de dicho haplotipo en los pacientes de inicio temprano tal como había referido Dermaut (Confaloni, 2003).

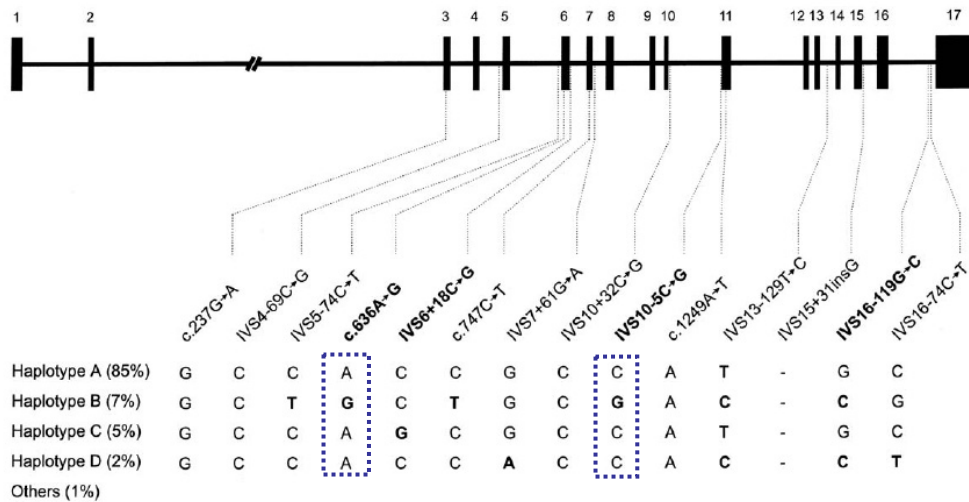


Figura 1.7: Estructura genómica de NCSTN y determinación de haplotipos. Se determina la localización y el cambio de cada uno de los polimorfismos. (Modificado de Dermaut, 2002)

En el mismo año Cousin y colaboradores realizaron un estudio en pacientes caucásicos de origen francés, determinando los cuatro polimorfismos que forman el haplotipo B (636 A/G, +18C/G, -5C/G y -119G/C) pero sin replicar la asociación determinada por Dermaut (Cousin, 2003).

Helisalmi y colaboradores en el 2004 analizaron, en población finlandesa, cuatro polimorfismos (636 A/G, +18C/G, -5C/G y -119G/C) que permiten distinguir entre los haplotipos A, B, C y D sin encontrar diferencias en las frecuencias genotípicas, sin embargo, al analizar los haplotipos encontraron que en pacientes sin el alelo $\epsilon 4$ de APOE había una diferencia en las frecuencias, determinada por la ausencia del haplotipo D en pacientes en relación con los controles y un leve aumento del haplotipo B en la muestra total de pacientes que es más notable para aquellos de inicio temprano (Helisalmi, 2004). En un estudio realizado por el equipo de Lovestone en el 2005 se toman pacientes cognitivamente sanos evaluados a la edad de 11 años y a la edad de 79 años, pertenecientes a una cohorte de pacientes conocida como *Lothian Birth Cohort 1921* (LBC1921) y se evalúa el efecto de los haplotipos de nicastrin en el desempeño

cognitivo. Los polimorfismos estudiados son rs12239747 (636 A/G), rs2274185 (+18C/G), rs7528638 (-5C/G) y -119G/C. De manera particular se encuentra un haplotipo adicional determinado como HapE y se encuentra que los individuos con al menos una copia del haplotipo B (hap B GCGC) tienen puntajes más altos en una prueba de razonamiento verbal. Estos hallazgos les permiten pensar que en individuos sanos, el haplotipo B tiene efecto en las habilidades cognitivas a lo largo de la vida y no está relacionado con cambios cognitivos asociados al envejecimiento. Por otra parte, estos resultados podrían explicar porque un coeficiente intelectual bajo en la niñez parece ser un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (más que de inicio temprano), por lo menos para la población escocesa estudiada (Deary, 2005)

En el año 2006, Confaloni y su grupo realizan un análisis en varios genes en una población considerada como aislado genético (la isla de Cerdeña) y determinan para nicastrin los polimorfismos 636 A/G en el exón 6, 747C/T en el exón 7 y -5C/G en el intrón 10, encontrando una mayor frecuencia del haplotipo B en pacientes con enfermedad de Alzheimer de inicio temprano respecto a los controles, hallazgo acorde con la publicación de Dermaut (Piscopo, 2006)

En el 2011 Lupton emplea una metodología novedosa para mirar el efecto de variantes raras en sectores codificantes del gen para determinar el riesgo para la Enfermedad de Alzheimer y encuentra que una de éstas confiere riesgo y fortalece la hipótesis de la acción de estas variantes raras en la heredabilidad de la enfermedad (Lupton, 2011).

1.4.4 APOE

El gen APOE o APOLIPOPROTEIN E (OMIM 107741), también conocido como AD2 y LPG, está localizado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.32) en humanos y tiene su homólogo en el cromosoma 7 de ratones. Está compuesto por cuatro exones y tres intrones a lo largo de 3600 pares de bases y codifica para una proteína de 299 aminoácidos, la Apolipoproteína E. A la fecha es el único factor de riesgo para la Enfermedad de Alzheimer (Hatters, 2006) que ha sido validado en diferentes poblaciones y en meta-análisis. Los alelos han sido determinados de la siguiente forma: el alelo $\epsilon 2$ posee una baja frecuencia alélica en la población, se ha reportado además que está ausente en algunas poblaciones de nativos americanos (Corbo, 1999); el alelo $\epsilon 3$ es el más frecuente en todos los grupos humanos, especialmente en poblaciones de economía agrícola (Corbo, 1999) y el alelo $\epsilon 4$ tiene una frecuencia alta en poblaciones como los

pigmeos, los Khoi San y en poblaciones aborígenes donde existe el forrajeo o la disponibilidad de alimento es escasa, lo cual lo haría un genotipo “ahorrador” además de ser el alelo ancestral (Zekraoui, 1997), ya que es el alelo presente en primates no humanos (Hanlon, 1995; Hixson, 1998 en Corbo, 1999). Este fenómeno explicaría su efecto deletéreo en sociedades occidentalizadas en las cuales existe una abundante disposición de alimento.

El alelo $\epsilon 4$ ha sido asociado con un aumento en el riesgo de presentar la enfermedad de Alzheimer y un descenso en la edad de inicio que se correlaciona con el número de alelos que se posean (Corder, 1993).

- Polimorfismos de nucleótido simple

Los polimorfismos más estudiados, no sólo en relación con la enfermedad de Alzheimer sino con diversas patologías son aquellos que codifican los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, denominados rs7412 y rs429358 (cambios C/T). A partir del metaanálisis realizado en el *Alzheimer Research Forum* (www.alzgene.org) se encuentran al menos 28 estudios en muestras de individuos caucásicos, 2 estudios de afrodescendientes, 4 estudios en asiáticos, 1 estudio en hispanos y al menos 3 estudios en poblaciones mezcladas o de otro origen. La asociación con el alelo $\epsilon 4$ produce un OR global de 3.68 (CI 3.30, 4.11). Adicionalmente existen estudios en otros polimorfismos del gen, si bien los resultados de los estudios de asociación son conflictivos. Los polimorfismos estudiados comprenden: rs769446 (-427) con OR que van desde 0.41 en asiáticos hasta 3.19 en caucásicos, rs449647 (-491) con OR que están entre 0.29 en asiáticos hasta 1.75 en otra población asiática, rs400446 (+113) con el alelo C como factor de protección (OR menores de 1.0), rs439401 con el alelo T con OR entre 0.33 y 0.75 (analizado en varios estudios de genoma amplio) y el rs405509 (-219) con OR menores de 1, excepto por el estudio de Bizzarro en el 2009 con un OR de 1.91.

1.5 Estudios de ligamiento y de asociación

El estudio de fenotipos asociados a enfermedades ha seguido tradicionalmente dos enfoques: el análisis de ligamiento basado en grupos familiares y los estudios de asociación basados en individuos de una población (Halder, 2003); de éstos, el análisis de ligamiento, en el cual se identifican regiones cromosómicas asociadas con una enfermedad por la medición de la segregación de marcadores particulares con un

fenotipo determinado dentro de una familia siguiendo tres pasos fundamentales: la identificación de un locus relacionado con la enfermedad, el secuenciamiento de la región encontrada en el paso anterior en un grupo de casos y controles para caracterizar mutaciones y la determinación de la función biológica y molecular del gen encontrado (Altschuler, 2008 en Guerreiro, 2012) ha resultado exitoso en la identificación de genes en enfermedades con herencia mendeliana simple (para este tipo de estudios en enfermedad de Alzheimer, ver Tabla 1), sin embargo, cuando se habla de enfermedades complejas, de etiología multifactorial, poligénicas, con penetrancia incompleta y que se desarrollan en etapas tardías de la vida (tal como es el caso de la Enfermedad de Alzheimer), tal aproximación presenta limitaciones y su validez suele ser menor respecto a estudios de casos y controles (Cardon, 2001; Halder, 2003; Guerreiro, 2012).

Chr	Región	N° estudios	LOD score	Genes *
1	1p13.3-q23.3	2	5.2	GSTM1; GSTM4; NGF; HMGCS2; APH1A; CHRN2; APOA1BP; CRP; NCSTN
	1q23.3-q31.1	3	2.1-4.0	F11R; USF1; APOA2; RXRG; PTGS2
5	5p13-p15	6	1.4-2.8	SLC6A3; PRKAA1
8	8p22-p21.1	2	>2.0	NAT1; NAT2; LPL; ADRA1A; CHRNA2; CLU
9	9p21	5	>1.0-4.6	IFT74
	9q22-q34	8	1.6-4.2	GOLM1; ABCA1; DFN31; TLR4; HSPA5; RXRA; ABCA2
10	10q21-q22	7	1.8-4.15	TFAM; ANK3; CDC2; EGR2; LRRTM3, SIRT1; CAMK2G; PLA2
12	12p11-p13	4	1.4-3.9	GAPDH; C1R; A2M; OLR1; LRP6; GRIN2B;
19	19q12-q13.33	9	1.6-7.7	LRP3; AKT2; APOE; PVRL2; TOMM40; APOC1; APOC2; CD33; NR1H2
21	21q21-q22	4	1.6-4.5	NCAM2; APP; C21orf63; BACE2

Tabla 1. Estudios de ligamiento para la Enfermedad de Alzheimer. Se mencionan los diez más interesantes, y se hace una selección cruzada con la base de datos de AlzGene. Chr=Cromosoma estudiado. *Se mencionan sólo algunos genes en cada región (Modificado de Guerreiro, 2012)

En enfermedades complejas, las variantes o alelos de riesgo son menos determinísticos y más probabilísticos; la presencia de alelos de riesgo puede incrementar levemente la posibilidad de presentar la enfermedad y se presume que dichos alelos pueden presentarse con una frecuencia mayor al 1% en la población (Lander, 1994 en Hirschhorn, 2002). La presencia de estas variantes fue inicialmente estudiada a partir de isoformas proteicas; posteriormente se pudo determinar a través de RFLPs (*restriction fragment length polymorphisms*) en la secuencia de ADN y luego se analizaron microsatélites, repeticiones variables en tándem (VNTRs, *variable number tandem*

repeats), inserciones/deleciones y polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) (Hirschhorn, 2002).

Al determinar el genotipo de estas variaciones en individuos con determinada enfermedad y en controles sanos, estos polimorfismos son puestos a prueba por su asociación respecto a la susceptibilidad frente a la enfermedad, en los llamados estudios de asociación cuyo diseño más común es el de casos y controles. En éstos, la frecuencia de alelos o genotipos en el sitio de interés es comparada en poblaciones determinadas y una frecuencia mayor en los casos es tomada como evidencia de que el alelo o genotipo afecta el riesgo de presentar dicha enfermedad (Hirschhorn, 2002).

Las publicaciones realizadas acerca de estudios de asociación para nuevas variantes genéticas en enfermedades complejas ha ido en aumento en los últimos años, sin embargo, muchos de éstos no han podido ser reproducidos debido a factores como el tamaño de muestra (Ioannidis, 2003) (los efectos de dichas variantes suelen tener un efecto leve, por lo cual se requiere un tamaño de muestra grande), estratificación en la población estudiada, desequilibrio de ligamiento variable (de Bakker, 2005), inadecuado apareamiento de casos y controles, sobredimensionamiento de los resultados y sesgos respecto a la publicación de resultados positivos (Cardon, 2001; Hirschhorn, 2002; Price, 2008; Sagoo, 2009). Con respecto a la estratificación, ésta existe cuando la población total ha sido formada por mezcla entre subpoblaciones y cuando las proporciones debidas a la mezcla varían entre individuos (Hoggart, 2003). Pero, tal como lo refiere Shriver, algunos autores han propuesto que poblaciones pequeñas y aisladas pueden ser mejores para el mapeo de genes, debido a su baja heterogeneidad y un mayor grado de desequilibrio de ligamiento (Shriver, 2003)

Es por tanto importante tener en cuenta los factores anteriormente enunciados al realizar el diseño del estudio de asociación con el fin de eliminar sesgos que impidan la reproducibilidad de los resultados obtenidos, y tal como lo refiere Sagoo en su revisión sistemática de estos estudios, analizar las publicaciones en el campo de interés, determinar la validez de la evidencia, la existencia real de la asociación, su consistencia y magnitud, ya que actualmente dichos estudios se identifican comúnmente con estudios de asociación de genoma amplio (Sagoo, 2009).

1.5.1 Estudio de haplotipos

A partir de la publicación de la secuencia completa del genoma humano (Lander, 2001; Venter, 2001) en su primera versión y la posterior publicación de la secuencia final (IHGSC, 2004), ha sido posible descubrir información tanto estructural como funcional sobre la expresión del genoma y aumentar la comprensión de algunas enfermedades humanas. Sin embargo, es mediante el estudio de las variaciones humanas por métodos basados en la comparación de haplotipos (combinaciones específicas de nucleótidos localizadas en el mismo cromosoma (Schaid, 2002)), como aproximación al mapeo de genes asociados a enfermedades y que dan origen a la construcción del mapa de haplotipos de distintas poblaciones (HapMap) (Gabriel, 2002; *International HapMap Consortium*, 2005; Manolio, 2008 y 2009) empleando polimorfismos de un solo nucleótido (*SNPs, single nucleotide polymorphism*); como es posible encontrar mayor información que ayude a comprender los desordenes neurológicos (Eichler, 2007; Hardy, 2008; Kidd, 2008), ampliando además el espectro de estudio a los análisis de genoma amplio (*GWAS genome-wide association study*) (Manolio, 2010).

Los haplotipos se refieren a un grupo de alelos heredados en un solo cromosoma. El análisis de haplotipos es importante para mapear genes de enfermedades, dilucidar la historia de las poblaciones, estudiar la genética evolutiva y explorar las interacciones cis en la regulación de la expresión génica. Los haplotipos cromosómicos pueden ser importantes para interpretaciones funcionales de SNPS en interacciones cis y la integración de juegos de datos genéticos y epigenéticos a lo largo de los cromosomas (Ma, 2010)

1.5.2 Estudio de asociación en genoma amplio

Los estudios de asociación de genoma amplio (GWAS, *Genome-wide association studies*) basados en la genotipificación de marcadores genéticos a gran escala y de alta densidad, capturan una proporción sustancial de variaciones comunes en el genoma a partir de muestras de ADN que son informativas para un rasgo de interés, con el objetivo de mapear la asociación entre la frecuencia de un genotipo determinado y el rasgo estudiado (Manolio, 2009). Puede llevarse a cabo en cohortes basadas en poblaciones específicas, en asociación basada en familias, aunque usualmente emplea el diseño de estudio de casos y controles (McCarthy, 2008). Emplean la tecnología de microarreglos

mediante la cual es posible estudiar cientos o miles de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) al mismo tiempo bajo el supuesto de “enfermedades comunes-variaciones comunes”.

Otros autores refieren que los estudios de genoma amplio son un tipo de estudios que se realizan bajo el supuesto de estar libres de hipótesis (Kitsios, 2009; Brookfield, 2010), es decir, se observan cambios en el genoma pero la asociación con el rasgo de interés se realiza a posteriori respecto a los hallazgos encontrados.

1.5.3 Estudio de asociación en genoma amplio en la Enfermedad de Alzheimer

En la Enfermedad de Alzheimer, este tipo de estudios ha permitido reportar algunas variaciones en genes específicos que muestran resultados promisorios respecto a su asociación con ésta, entre ellos se encuentran BIN, CLU, PICALM y CR1 (Bertram, 2010). (Tabla 2).

Sin embargo, existen desventajas que hay que tener en cuenta en este tipo de estudios, en los GWAS los efectos son bastante pequeños (incremento del riesgo en pacientes versus controles entre 0.10 y 0.15 veces) comparados con el incremento en el riesgo del alelo $\epsilon 4$ de APOE que es de entre 4 y 15 veces; y, aunque no hay estimativos precisos, se piensa que la proporción de heredabilidad determinada por los GWAS para el LOAD (*Late Onset Alzheimer's Disease*), así como para otras enfermedades complejas, no es superior al 50%, lo cual deja un porcentaje importante de heredabilidad “perdida” o la llamada “materia oscura” de los GWAS, dado que se sabe que existe pero no ha podido ser observada (Manolio 2009b; Bertram, 2010; Manolio, 2010, Tanzi, 2012) además su costo es alto.

Esta “materia oscura” puede ser explicada por la existencia de variantes comunes que no se encuentran incluidas en los microarreglos, variaciones estructurales referentes al número de copias, e incluyen inserciones/deleciones y rearrreglos, y las variantes raras cuyas frecuencias del alelo menor MAF (*minor allele frequency*), son menores del 5% (Tanzi, 2012)

Estudio	Diseño	Población	N° SNPs	Hallazgos
Grupe, 2007	Caso/Control	UK, USA	17343	SNPs en TOMM40; APOE; 14q32.13; APOC1; APOC2
Reiman, 2007	Caso/Control	USA	312316	APOE; GAB2
Bertram, 2008	Familias	USA	484522	14q31.2; ATXN1
Harold, 2009	Caso/Control	USA, EU	529205	APOE; CLU; PICALM
Lambert, 2009	Caso/Control	USA, EU	537029	CLU; CR1
Carrasquillo, 2009	Caso/Control	USA, EU	313504	APOE; PCDH11X
Seshadri, 2010	Caso/Control	USA, EU	NA	APOE; BIN1
Hollingworth, 2011	Caso/Control	USA, EU	NA	ABCA7; CD33; EPHA1

Tabla 2. Selección de estudios de asociación de genoma amplio (*Genome wide association studies*) realizados en Enfermedad de Alzheimer. (Modificada de Tanzi 2012, Guerreiro, 2012)

1.6 1000 genomas

El proyecto de los 1000 genomas, creado como una estrategia para generar bases de datos públicas de polimorfismos de ADN de variaciones comunes en diferentes poblaciones mediante la secuenciación de alto rendimiento, mostró en la primera fase del proyecto la existencia de protocolos robustos para generar estos datos, así como algoritmos validados para la detección de variantes y que la secuenciación de baja cobertura es una aproximación eficiente en estudios de genoma amplio, mientras que la secuenciación específica detecta variantes raras en regiones funcionales de interés como los exones (1000 *Genomes Project Consortium*, 2010). Adicionalmente, en la siguiente fase del proyecto permite generar un mapa de haplotipos de 38 millones de SNPs, datos de 1.4 millones de deleciones e inserciones cortas así como un número importante de deleciones de fragmentos mayores. Permite también mostrar que cada individuo posee cientos de variantes raras, no codificantes en sitios conservados. Con respecto a la frecuencia de las variaciones encontradas, los datos del proyecto de los 1000 genomas permiten capturar el 98% (SNPs) de aquellas presentes en al menos 1% en poblaciones relacionadas (1000 *Genomes Project Consortium*, 2012).

1.7 Contexto nacional

Colombia es uno de los países con población más diversa de Latinoamérica (Rojas, 2010), conformada por una mezcla de europeos, amerindios y africanos con patrones de mezcla que difieren entre las regiones (Bedoya, 2006).

Antioquia es una región que permaneció relativamente aislada luego del período colonial. Así, los estudios realizados por medio de marcadores genéticos uniparentales (ADN mitocondrial y cromosoma Y) y biparentales (cromosoma X y autosómicos) han permitido determinar poca subdivisión de la población a partir del pool genético fundador y confirmar el aislamiento de la misma (Carvajal-Carmona, 2000; Mesa, 2000; Arcos-Burgos, 2002; Bedoya, 2006; Service, 2006), evento que la confirma como un buen candidato para estudios de asociación.

Respecto a la Enfermedad de Alzheimer, Arango en el 2001 realiza un análisis mutacional de genes causativos en pacientes con agregación familiar y esporádicos reportando una mutación nueva en Presenilina 1 en un caso sin agregación familiar conocida (Arango, 2001); Arboleda en el 2001 reporta las frecuencias de los alelos de APOE en una muestra de mestizos-caucásicos, Parra-Bonilla en el 2003 realiza un estudio en polimorfismos del promotor de APOE y encuentra que el -491 A/T incrementa el riesgo para la enfermedad aunque no esclarece si son familiares o esporádicos, Camelo en el 2004 estudia polimorfismos en ACE y A2M en 83 pacientes colombianos de los cuales 47 son esporádicos pero no encuentra asociación y Forero en el 2006 publica dos artículos sobre el estudio de polimorfismos en genes asociados a plasticidad sináptica (BDNF, COMT y UCHL1) y en los genes LRP1, tau y 5-HTT en 106 pacientes colombianos (Arboleda, 2001; Parra-Bonilla, 2003; Camelo, 2004; Forero, 2006a y b). En el año 2006 Contreras publica un reporte de caso sobre la asociación entre síntomas depresivos y la enfermedad de Alzheimer en un grupo familiar. En el año 2012, un trabajo de investigación realizado en el Grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional con pacientes con enfermedad de Alzheimer permitió determinar la asociación de marcadores reportados en publicaciones de estudios de genoma amplio (GWAS) en población colombiana (Ortega, 2012)

Por otra parte, en Antioquia se ha reportado el grupo familiar más grande del mundo con Enfermedad de Alzheimer por la mutación E280A en el gen de la presenilina 1, la cual causa inicio temprano y un cuadro de deterioro muy agresivo; éste ha sido estudiado

clínica, imagenológica, molecular, fisiológica, psicológica y neuropatológicamente a lo largo de los últimos años (Lopera, 1997; Pastor, 2003), permitiendo incluso determinar claramente las etapas de progresión clínica antes de la aparición de la demencia (Acosta-Baena, 2011). Sin embargo, los estudios con pacientes esporádicos en esta región hacen referencia a datos neuropsicológicos realizados por Velásquez en el 2000 y estudios neuropatológicos realizados por García en el 2003 mediante la técnica de TUNEL: En el año 2012, se publica una descripción clínica y correlación entre la enfermedad de Alzheimer y diabetes mellitus para una muestra de pacientes en Antioquia, pero sin encontrar correlación con el genotipo de APOE (Botero, 2012), por lo cual la propuesta de estudiar genéticamente a dichos pacientes cubre un vacío de información que existe actualmente en este campo con respecto a los reportes de otras zonas del país.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Analizar polimorfismos en genes asociados con la producción y aclaramiento del péptido β amiloide en una muestra de pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico evaluados en el Grupo de Neurociencias de Antioquia y un grupo control, en el período comprendido entre el 2011 y 2013,

2.2 Objetivo específicos

- Caracterizar polimorfismos en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE en pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico e individuos control.
- Comparar las frecuencias alélicas y genóticas de los polimorfismos en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE en una muestra de pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico e individuos control.
- Determinar la relación entre las frecuencias de alelos y genotipos en los genes mencionados y el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico.

3. Metodología

3.1 Tipo de estudio

Este es un estudio preliminar de tipo exploratorio por factibilidad en casos y controles, en el cual los pacientes (casos) cumplen los criterios del DSM-IV-TR (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) (APA, 2000) para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y los controles son sujetos sanos de la población general. Ambos grupos están conformados por individuos que provienen de la región de Antioquia.

3.2 Universo de estudio

A partir de la base de datos SISNE de pacientes del Grupo de Neurociencias de Antioquia, compuesta por 12882 registros de individuos estudiados en el grupo, se generaron reportes de pacientes con diagnóstico de Trastorno cognoscitivo leve en una primera evaluación que evolucionara a Demencia en la Enfermedad de Alzheimer en evaluaciones subsiguientes según la Clasificación estadística Internacional de Enfermedades en su décima versión CIE-10 (OPS, 2003) (Anexo D) y se realizaron búsquedas cruzadas de estos reportes con los pacientes pertenecientes al proyecto de Alzheimer tardío y Búsqueda genómica total.

Para la selección de controles se generaron reportes de los proyectos Validación de escalas y pruebas neuropsicológicas en población general (>50 años) y Búsqueda genómica total.

A partir de estos reportes (~300 registros) se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión para determinar la muestra de individuos a estudiar.

3.3 Selección de la muestra: criterios de inclusión y exclusión

La selección de la muestra se realizó a partir de los reportes generados de la base de datos SISNE, y el procedimiento estuvo basado en la revisión de historias clínicas (datos demográficos, evaluación neurológica, neuropsicológica, genealogía e imágenes de resonancia magnética) y aplicación de los criterios.

- Criterios de inclusión:

Pacientes	Controles
Individuos mayores de 50 años	
Individuos provenientes de la región de Antioquia	
Sin antecedentes familiares de demencia.	
Individuos con deterioro cognitivo compatible con criterios diagnósticos del DSM-IV para enfermedad de Alzheimer	Individuos sin deterioro cognitivo ni quejas de memoria, determinado en evaluación médica y/o neuropsicológica.
Evaluación médica y neuropsicológica que documente el deterioro cognitivo y las quejas de memoria.	

Tabla 3. Criterios de inclusión para el presente estudio

Los individuos que cumplieron los criterios de inclusión y firmaron el consentimiento informado para la donación de muestras (Anexo E) fueron tenidos en cuenta para el presente estudio. El protocolo de investigación fue aprobado por los comités de ética de la Sede de Investigación Universitaria SIU de la Universidad de Antioquia y la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia (Anexos F y G).

- Criterios de exclusión:

Pacientes	Controles
Individuos menores de 50 años	
Individuos cuya procedencia sea diferente de la región de Antioquia	
.Individuos que manifiesten su intención de retirarse del Proyecto.	
Individuos con otras enfermedades neurológicas o antecedentes personales y/o familiares de otras enfermedades neurológicas.*	
Individuos con antecedentes personales y/o familiares de enfermedades psiquiátricas.*	
Individuos menores de 65 años	
Individuos con deterioro cognitivo compatible con criterios diagnósticos del DSM-IV para enfermedad de Alzheimer, CON HISTORIA FAMILIAR DE DEMENCIA*	
Individuos con diagnóstico de demencia por la mutación E280A de PS1.	

Tabla 4. Criterios de exclusión para el presente estudio. *Documentado en la historia clínica de SISNE o en la genealogía

Esta es una muestra de conveniencia, el método corresponde a un estudio de casos y controles en una proporción cercana de 1:2. En la determinación de la misma no se empleó la estrategia de emparejamiento por edad.

3.4 Definición de variables

La variable dependiente fue definida como el deterioro cognitivo debido a la presencia de depósitos del péptido β amiloide. Se tomaron como variables independientes los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE.

3.5 Selección de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs)

A partir de la hipótesis funcional, en la cual variaciones de nucleótido simple en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE (relacionados con el procesamiento y aclaramiento de APP (*amyloid precursor protein*)), podrían estar asociadas con la susceptibilidad frente a la enfermedad de Alzheimer; se realizó la selección de los polimorfismos a evaluar mediante la consulta en la base de datos de datos Alzgene (www.alzgene.org) (Bertram, L.) reportada en la página del Alzheimer Research Forum (www.alzforum.org) (Bertram, 2007). Se tomaron en cuenta polimorfismos que hubiesen sido reportados en metanálisis en los genes seleccionados y adicionalmente se revisaron publicaciones recientes que reportaran estudios en polimorfismos específicos y en los cuales se determinaran correlatos funcionales.

3.6 Obtención de ADN

Las alícuotas de 20, 50 o 100 μ l de ADN genómico fueron obtenidas a partir de muestras almacenadas a -20°C en el Neurobanco del grupo. Estas muestras de ADN fueron extraídas a partir de sangre total mediante el kit Gentra PureGene de Qiagen. Brevemente este protocolo es una modificación del método de precipitación por salting-out para la purificación de ADN, en el cual se rompen las células con un detergente aniónico, se remueve el ARN presente con una enzima de digestión específica y las proteínas son removidas posteriormente por precipitación salina. El DNA se precipita con

Etanol y se disuelve en un buffer de hidratación (EDTA y Tris Cl) en el cual es almacenado. En el caso de pacientes nuevos las alícuotas se obtuvieron inmediatamente después de la extracción y rehidratación.

3.7 Cuantificación y preparación de platos

Las alícuotas obtenidas fueron cuantificadas en los equipos Thermo Scientific NanoDrop 2000 y Thermo Scientific NanoDrop 2000c para determinar la concentración de DNA de cada muestra, verificar la calidad de la misma (proporción A_{260}/A_{280}) y realizar las diluciones de trabajo a una concentración final de 50ng/ μ l. La muestra empleada como blanco para esta determinación fue la solución de rehidratación provista en el kit Genra PureGene de Qiagen.

Una vez determinadas las concentraciones iniciales de cada alícuota, se procedió a preparar los platos maestros con la concentración de trabajo a un volumen final de 200 μ l ($C1 * V1 = C2 * V2$) y fueron almacenadas a -20°C.

A partir de los platos maestros se prepararon platos para amplificación y restricción de cada uno de los marcadores a genotipificar (réplicas). En cada pozo de estos platos se procedió a servir 2 μ l de ADN.

3.8 Diseño de primers

Para la amplificación de los polimorfismos escogidos en cada uno de los genes de interés, se diseñaron primers a partir de la secuencia Fasta reportada en la base de datos dbSNP del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>), mediante el programa Primer3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) (Rozen, 2000) (Anexo H). Se corroboró la longitud y especificidad de los fragmentos amplificados mediante una PCR *in silico* en la página del buscador en el genoma de la Universidad de California en Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/>) y la herramienta de alineamiento Primer-blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) del NCBI.

3.9 Selección de enzimas de restricción

A partir de los fragmentos generados luego del diseño de primers se determinó, teniendo en cuenta la secuencia del polimorfismo, la enzima de restricción para cortar dichos fragmentos en el sitio de interés mediante el uso de la herramienta NEBcutter v2.0 de New England BioLabs Inc. (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) (Anexo I)

3.10 PCR-RFLP

Esta técnica, desarrollada en 1985, permite amplificar fragmentos de ADN de interés mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y posteriormente cortarlos en sitios de reconocimiento específicos por medio de enzimas de restricción para generar un patrón de fragmentos de ADN de longitud variable y observarlos en una electroforesis en gel de agarosa (Saiki, 1985).

3.10.1 Amplificación de marcadores

Para cada marcador se determinaron, por medio de gradientes, las condiciones de amplificación respecto a dos parámetros: la temperatura de alineamiento y la concentración de cloruro de magnesio. Se optimizaron los volúmenes finales de reacción en 15 o 25 μ l. Luego de esta estandarización, se procedió a amplificar los platos en los termocicladores MultiGene Optimax TC 9610 de Labnet Inc, SureCycler 8800 de Agilent Technologies y/o PTC-200 de MJ Research (Anexo J).

Los fragmentos obtenidos fueron visualizados en un gel de Agarosa. De cada uno de ellos se obtuvo una imagen en el equipo BioDocIt Transilluminator de UVP Inc. (Anexo K)

3.10.2 Digestión

Luego de la revisión de los amplicones para cada marcador se montaron las digestiones según las condiciones de la casa fabricante. Posteriormente se visualizaron los patrones de bandas por medio de electroforesis en gel de Agarosa a distintas concentraciones determinadas por la diferencia en pares de bases de las bandas a observar (Anexo K). Los genotipos fueron determinados a partir de las imágenes obtenidas y se almacenaron en un archivo de Excel.

3.11 PCR competitiva alelo específica

La determinación de algunos polimorfismos se realizó por medio de ensayos de genotipificación KASP™ (*Kompetitive Allele Specific PCR*). En ésta, se diseñan dos primers directos con los alelos a discriminar, cada uno con un marcador fluorescente FAM™ u HEX™ y un primer inverso en común. Se realiza la PCR y se hacen lecturas de fluorescencia. La discriminación del alelo de interés se realiza por medio de la unión competitiva de los primers directos. De tal manera que si el genotipo es homocigoto presentará sólo una señal de fluorescencia y ambas señales si es heterocigoto (Anexo L). Esta genotipificación fue realizada en LGC Genomics (<http://www.lgcgenomics.com>)

3.12 Análisis estadísticos

Se prepararon archivos para ser analizados en los programas: GenePop (<http://genepop.curtin.edu.au/>) (Raymond, 1995; Rousset, 2008), SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>) (Sole, 2006), PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) (Purcell, 2007) y Haploview (Barrett, 2005). Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada marcador, se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas, se realizaron análisis de asociación y se determinaron los OR e intervalos de confianza. Se determinaron haplotipos y frecuencias de los mismos.

4 Resultados y Discusión

- Población de estudio

La población de estudio está conformada por 133 individuos, de los cuales 46 son pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico y 87 son individuos control.

	Pacientes N=46 (34.59%)		Controles N=87 (65.41%)	
	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino
Tamaño muestral	36	10	67	20
Género (%)	78	22	77	23
Edad (\bar{x})	76.41		70.34	
Rango	65-94		56-88	
Escolaridad (%)				
0 a 5	46		47	
6 a 11	39		33	
12 a 16	15		11	
> 16	0		8	
Ocupación (%)				
C. Básico	67		69	
C. Medio	26		17	
C. Alto	3		14	
Estado civil (%)				
Soltero	2		9	
Casado	37		54	
Separado/Divorciado	2		3	
Viudo	59		33	
Unión libre	0		1	
Lateralidad (%)				
Diestro	89		97	
Zurdo	11		1	
Ambidiestro	0		1	
N° Hijos (\bar{x})	7.3		4.1	

Tabla 5. Datos demográficos de la población de estudio.

La representación por género es equivalente entre el grupo de pacientes y controles, con un mayor número de mujeres, lo cual está de acuerdo con publicaciones que determinan una mayor incidencia de demencia en este género (Fratiglioni, 1997, Andersen, 1999 en Placanica, 2009), adicionalmente una publicación refiere una mayor actividad dependiente de género de la enzima gamma secretasa en el modelo murino, lo cual podría ayudar a explicar el incremento de mujeres con enfermedad de Alzheimer esporádico (Placanica, 2009).

La diferencia en el promedio de edad refleja el criterio de exclusión adicional en el caso de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, debido a que fueron eliminados del estudio pacientes con inicio temprano, es decir menores de 65 años, que pudieran reflejar ser los únicos casos captados al momento del estudio pertenecientes a grupos familiares cuya causa pudiera ser genética.

En un estudio publicado en el 2012, investigadores italianos reportan un caso esporádico de inicio tardío y presentación inusual de la enfermedad con una mutación en Presenilina 1 (Borroni, 2012); debido a reportes como éste y teniendo en cuenta la heterogeneidad en la presentación y curso de la enfermedad, uno de los parámetros del estudio fue la aplicación rigurosa de criterios de exclusión para tomar en cuenta pacientes con síntomas mnésicos exclusivamente, descartando presentaciones atípicas de otros síntomas que hacen parte del síndrome, seguidos por una revisión exhaustiva de la historia clínica, genealogía y resultados de resonancia magnética, para realizar este estudio en pacientes esporádicos de inicio tardío y un cuadro de deterioro de memoria típico para asegurar un grupo más homogéneo de pacientes para la búsqueda de polimorfismos que confirieran susceptibilidad.

Con respecto a la escolaridad de la población, es interesante notar que el mayor porcentaje de individuos pertenece al nivel de básica primaria y el grupo de pacientes no tiene representación en el nivel superior de educación (post universitaria). Esto puede estar asociado al vínculo reportado en la literatura entre el nivel educativo y la reserva neural o cognitiva, adicional a la existencia de redes neurales compensatorias frente al proceso de deterioro cognitivo (Reitz, 2009; Ewers, 2013; Morbelli, 2013).

Adicionalmente, esta diferencia en escolaridad puede así mismo estar asociada al rango de edad de ambos grupos (los individuos control son más jóvenes) indicando un mayor acceso a la educación en la muestra control.

Con respecto a la ocupación, dada la heterogeneidad de datos obtenidos, se determinaron categorías, teniendo como parámetro de la labor realizada antes de la enfermedad para los pacientes y la ocupación actual para los controles, el tipo de desempeño o reto cognitivo de la ocupación; estas actividades, así como el nivel de escolaridad, pueden ser considerados como marcadores de reserva cognitiva. Se observa que la mayoría de individuos desempeña labores básicas y de nuevo un mayor número de individuos control desempeñan actividades consideradas de reto cognitivo alto.

En el estado civil de la población se encontró un mayor número de pacientes viudos (59% en pacientes vs 33% en controles) frente a un mayor número de individuos control que están casados (37% en pacientes vs 54% en controles). Si bien estudios preliminares realizados por Beard y colegas sobre factores demográficos y su incidencia en la enfermedad no hallaron asociación con el estado civil, educación y ocupación; estudios posteriores, que han realizado el seguimiento de individuos durante varios años, han permitido mostrar que los individuos que viven con un compañero/a tienen un menor riesgo de presentar deterioro cognitivo en la vejez con respecto a los individuos que están separados o viudos y el argumento a favor de este hallazgo es el desafío social y cognitivo que conlleva mantener una relación de convivencia (Håkansson, 2009)

Con respecto a la lateralidad, los resultados son contradictorios; en un estudio realizado por Seltzer en 1984 se encontró una mayor prevalencia de zurdos entre los pacientes de inicio temprano con respecto a los de inicio tardío, sugiriendo que ambas presentaciones de la enfermedad podrían ser biológicamente distintas, sin embargo, de Leon en 1986 encuentra una baja frecuencia de zurdos respecto a su población control y menciona que serían menos vulnerables a los cambios cognitivos relacionados con la enfermedad.

Un estudio realizado en el 2008 por Siengthai utilizó metodologías alternativas al autoreporte de lateralidad por parte de los pacientes y refiere que los individuos zurdos podrían tener un menor desempeño cognitivo en las pruebas neuropsicológicas.

Recientemente, un estudio reportó atrofia en el hipocampo y amígdala de sujetos sanos pero asociada con individuos ambidiestros. Adicionalmente este estudio refiere

resultados anteriores en los cuales no se encuentra efecto de la lateralidad o por el contrario afirma una edad de inicio temprana para los zurdos pero con una tasa de deterioro más lenta (Cherbuin, 2011).

En la población estudiada se encuentra que la mayoría de individuos son diestros, sin embargo, la representación de pacientes con enfermedad de Alzheimer zurdos es superior respecto a los controles (11% vs 1%) y todos los pacientes zurdos tienen una edad de inicio superior a los 75 años, en clara oposición con algunos datos reportados en la literatura.

Con respecto al número de hijos varios autores han postulado que el número de embarazos, así como la diferencia entre tener o no hijos podría afectar la edad de inicio así como el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer. Particularmente un estudio reporta asociación en mujeres y no en hombres del número de hijos con los cambios neuropatológicos hallados, sugiriendo un mecanismo específico de género para las lesiones que podría estar asociado a los niveles de estrógenos o de hormona luteinizante (Beeri, 2009). En la población de estudio los pacientes tienen mayor número de hijos en promedio (7.3 vs 4.1 en individuos control), el percentil 95 con 13 hijos y el valor más alto con 20 hijos. (Anexo M)

Las mayores diferencias en la caracterización de variables demográficas entre el grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer esporádico y los individuos control se encuentra en las categorías lateralidad y número de hijos, (valores p de 0.002 y 0.011 respectivamente) (Anexo M).

Como datos clínicos relevantes para el perfil de pacientes estudiados con enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico se determinó el promedio de edad de inicio de quejas de memoria con impacto en 74.68 años y el promedio de edad de inicio de la demencia en 76.85 años. Vale la pena destacar que la edad registrada para el estudio es la de edad de inicio de la demencia (*Age at onset, AAO*), y los pacientes presentan edades de inicio tan tardías como 85 y 94 años. Esto podría estar relacionado con sesgos en el diagnóstico clínico y sesgos en la detección de pacientes; aunque también podría tener relación con factores protectores y/o la composición ancestral de la población estudiada. Como parte de la caracterización de la población estudiada se determinaron los alelos del gen APOE mediante la genotipificación por una PCR competitiva alelo específica

KASP™ (*Kompetitive Allele Specific PCR*) para los polimorfismos rs429358 y rs7412. El alelo $\epsilon 2$ esta representado por una T en el primer SNP y una T en el segundo, el alelo $\epsilon 3$ presenta una T en el primer SNP y una C en el segundo y el alelo $\epsilon 4$ presenta una C en ambos SNPs. Se determinó la presencia o ausencia del alelo $\epsilon 4$ APOE y la distribución de alelos y genotipos para ambos grupos.

Por otra parte se indica el promedio del puntaje obtenido en los distintos componentes de la prueba de MMSE (*MiniMental State Examination*, Folstein, 1975 en McKhann, 1984) para ambos grupos, tal como figura en los registros de la base de datos neurológica SISNE.

	Pacientes N=46 (34.59%)	Controles N=87 (65.41%)
Presencia/Ausencia alelo $\epsilon 4$ de APOE (%)	63/37	15/85
MMSE (\bar{x})		
Tiempo	1.36	4.93
Lugar	2.86	4.95
Fijación	2.18	2.99
Atención/Cálculo	2.98	4.92
Evocación	0.25	2.29
Lenguaje	6.2	8.9
TOTAL	16.07	28.98

Tabla 6. Caracterización de la población respecto a la presencia/ausencia del alelo de APOE y datos del MMSE (Tomados de la base de datos neurológica SISNE).

Respecto a los datos de presencia o ausencia del alelo $\epsilon 4$ del gen APOE, se observa una clara diferencia entre los grupos, mostrando un porcentaje mayor de individuos sin el alelo entre los controles (85% vs 37%) y la presencia de dicho alelo en los pacientes en relación con los controles (63% vs. 15%). La diferencia entre ambos grupos es significativa, siendo mayor para la presencia de al menos un alelo $\epsilon 4$ (valor p de 5×10^{-8}) entre pacientes con enfermedad de Alzheimer e individuos control.

Dado que éste es un factor de riesgo reconocido para la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico (Strittmatter, 1993; Corder, 1993), los datos encontrados en la población estudiada ratificarían dicho comportamiento.

En la evaluación de desempeño en el MMSE, se presenta alta variabilidad que puede ser atribuida a los distintos estadios de la enfermedad en el grupo de pacientes evaluados, cabe destacar que las mayores diferencias entre los grupos se presentan en las

categorías Evocación, Puntaje total obtenido y el componente de ubicación en el tiempo (valores p de 0.0003, 0.0006 y 0.0016 respectivamente) (Anexo M).

- Polimorfismos evaluados

Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) evaluados en pacientes e individuos control

GEN	Chr	SNP	Pos Chr	Secuencia	Anc	MAF	OR 95%CI	
ADAM10	15	rs17269348	58824641	GCAATT[A/G]TAAAAT	A	G=0.043	1.15 (1.03 – 1.28)	G vs A
		rs514049	59042363	TCTTAA[A/C]GTCACA	A	C=0.311		
		rs653765	59042012	TTTCGA[A/G]GGAGGG	G	T=0.425		
BACE1	11	rs535860	117159878	TCTGCC[A/T]GGGTAC	A	T=0.114	0.96 (0.80 – 1.17)	A vs T
		rs638405	117163824	AATGAT[C/G]ACCTCA	C	C=0.488		
NCSTN	1	rs12239747	160321065	CCCACT[A/G]TGTGCC	G	G=0.090	0.99 (0.73 – 1.34)	G vs A
		rs7528638	160323903	GTACCC[C/G]CCAGGT	C	G=0.041		
APOE	19	rs405509	45408836	AGTAAT[A/C]CAGACA	C	T=0.493	0.73 (0.69 – 0.78)	C vs T
		rs429358	45411941	GACGTG[C/T]GCGGCC	C	C=0.149		
		rs7412	45412079	CAGAAG[C/T]GCCTGG	C	T=0.074		

Tabla 7. Chr=Cromosoma; Pos Chr=Posición en el cromosoma; Anc=Alelo ancestral; MAF=Minor allele frequency; OR=Odds Ratio; Datos tomados de www.alzgene.org y www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP, La posición en el cromosoma definida para GRCh37.p10 Genome Reference Consortium Human Build 37 patch release 10

Los diez polimorfismos fueron evaluados por medio de PCR-RFLP o KASP™. Se excluyeron del estudio tres polimorfismos, uno de ellos (rs2274185) por el bajo porcentaje de datos genotificados luego de realizar el control de calidad y dos polimorfismos (rs449647 y rs769446) por problemas técnicos con una PCR anidada que no pudieron ser resueltos.

- Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) postula que en poblaciones de gran tamaño, cuyos apareamientos se realizan al azar, en ausencia de factores como mutación, selección y migración, las frecuencias alélicas y genotípicas permanecen constantes a través de las generaciones (Wigginton, 2005; Hartl, 2007). Actualmente, el uso de este concepto ha sido ampliado en estudios de enfermedades humanas para detectar errores de genotificación y susceptibilidad frente a la enfermedad (Ryckman, 2008). Para la determinación del EHW se analizaron los datos de los genotipos obtenidos en los programas GenePop, SNPStats y PLINK (Anexo N).

El análisis en PLINK se realiza mediante un test exacto de probabilidades, tal como se encuentra descrito en el trabajo de Wigginton, y es un tipo de análisis más preciso para genotipos raros, tal como es el caso de algunos marcadores escogidos (Wigginton, 2005 en Purcell, 2007). El marcador rs514049 de ADAM10 y el marcador rs638405 de BACE1 se encuentran en desequilibrio de Hardy-Weinberg, el primero presenta un valor menor de 0.05 para toda la población estudiada (0.0302) y el segundo presenta valores menores tanto para la población como un todo como para los controles (valores p de 0.0416 y 0.00306 respectivamente). Para el marcador rs429358 se encuentra un valor p limítrofe de 0.0503 para los pacientes. Tal como refiere Wigginton, las desviaciones del EHW en marcadores particulares pueden sugerir problemas de genotipificación, estructuración de la población o, en muestras de individuos afectados, una asociación entre el marcador y la susceptibilidad a la enfermedad (Wigginton, 2005). Respecto a los problemas de genotipificación, en dichos marcadores, rs514049 y rs638405, luego del análisis preliminar de datos, se tomaron aleatoriamente 15 muestras para ser genotipificadas de nuevo (~10% de la población) obteniendo los mismos genotipos determinados en la genotipificación inicial. Este hallazgo de desequilibrio podría indicar asociación entre el rasgo estudiado y dichos marcadores. Al realizar la corrección por Bonferroni, dado un valor alfa (α) de 0.05 y teniendo en cuenta que son marcadores bialélicos, es decir, se generan tres genotipos, el valor de aceptación de la prueba estaría dado por $P = \alpha / 3 = 0.01666$, aunque también se pueden considerar las comparaciones realizadas en los 10 SNPs es decir $P = \alpha / 30 = 0.00166$. Este valor permitiría que incluso el valor p para los controles del marcador rs638405 se encontrara en la zona de aceptación de la prueba.

Para el análisis en SNPStats se realiza también un test exacto y se determinan los valores p para cada grupo. En el caso de la población estudiada, los datos obtenidos para este programa concuerdan con los análisis realizados en PLINK.

Para el análisis en GenePop se realiza una test de probabilidad para cada locus en cada población, teniendo como hipótesis nula la unión aleatoria de los gametos en la población y como hipótesis alterna la unión NO aleatoria de los gametos en la población. En esta prueba, la probabilidad observada en la muestra permite definir la zona de rechazo de la hipótesis y el valor p calculado corresponde a la suma de probabilidades de todas las tablas con igual o menor probabilidad, tal como está calculado en la prueba exacta para HW de Haldane, 1954 y Weir en 1996, entre otros (Rousset, 2008). En esta prueba se presentan los valores p para pacientes y controles, el valor de chi-cuadrado y la

probabilidad conjunta del test (Anexo N). Los valores de chi-cuadrado más altos se observan para los marcadores rs514049 de ADAM10, rs638405 de BACE1 y rs429358 de APOE, sin embargo, los valores p calculados permiten rechazar la hipótesis nula únicamente para los controles de rs638405 de BACE1. Debido a esto se realizan pruebas de hipótesis para el déficit o exceso de heterocigotos, tal como se menciona en el trabajo de 1995 de Rousset, implementado en el programa (Rousset, 1995; Goudet, 1996) mediante la prueba “*U test*” o prueba de puntajes para determinar si alguno de estos eventos incide en el EHW. En éstas, se acepta la hipótesis de exceso de heterocigotos para el marcador rs638405 de BACE1 en el grupo control, y el marcador rs429358 de APOE para el grupo de pacientes (valores p de 0.0025 y 0.0377 respectivamente). De manera alternativa, la prueba de déficit de heterocigotos entre poblaciones arroja un valor p de 0.0270 para el marcador rs514049 de ADAM10.

- Frecuencias alélicas

Se realizaron análisis en los programas PLINK, SNPStats y GenePop (Anexo O). Se generó una tabla comparativa de frecuencias alélicas, para Antioquia se reportan los datos concernientes al grupo de pacientes y el grupo de individuos control. La columna de Alzgene refiere las frecuencias reportadas para distintas publicaciones o diferentes grupos poblacionales con enfermedad de Alzheimer y las columnas tomadas de HapMap refieren datos de población general de diferentes regiones geográficas, así como la columna de 1000 genomas, que representa la variación en la población colombiana, siendo una buena aproximación a los datos que se reportan para Antioquia.

Las frecuencias alélicas entre pacientes y controles no presentan mayores diferencias, excepto para los marcadores rs514049 de ADAM10 y rs429358 de APOE; en ambos marcadores hay una menor frecuencia del alelo C en el grupo control.

Las diferencias en las frecuencias de pacientes reportadas para Antioquia con respecto a las frecuencias reportadas en la base de datos Alzgene pueden ser debidas al tamaño muestral, así como a la composición ancestral de la muestra estudiada. Particularmente, la frecuencia del alelo G para el marcador rs653765 de ADAM10 es mucho mas alta en los pacientes de Antioquia y la frecuencia de los alelos del marcador rs535860 en BACE1 es inversa al reporte de Alzgene, si bien se esperaría que por la composición genética ancestral del grupo antioqueño, de predominancia caucásica, esta fuera una fracción de la reportada para estudios en caucásicos.

GEN	SNP	Alelos	FRECUENCIAS ALÉLICAS									
			Antioquia		1000 Genomes ^a	Alzgene ^b	NCBI HapMap ^c					
			Alz	Ctrl	CLM		CEU	HCB	YRI	MEX		
ADAM10	rs17269348					Ca						
	n=133	A	0.946	0.943	0.90	0.87	0.884	1.0	1.0	0.959		
	100%	G	0.054	0.057	0.10	0.13	0.116	0.0	0.0	0.041		
	rs514049					Prinzen, 2005						
	n=114	A	0.5	0.676	0.5	0.41	0.367	0.907	0.898	0.620		
	85.71%	C	0.5	0.323	0.5	0.59	0.633	0.093	0.102	0.380		
ADAM10	rs653765					Prinzen,2005 Laws,2009						
	n=129	A	0.554	0.5	0.666	0.73 0.72	0.704	0.163	0.257	0.49		
	96.99%	G	0.445	0.5	0.333	0.27 0.28	0.296	0.837	0.743	0.51		
	BACE1	rs535860					Ca					
		n=133	A	0.891	0.879	0.891	0.12	0.888	0.867	0.881	ND	
		100%	T	0.108	0.120	0.108	0.88	0.112	0.133	0.119	ND	
rs638405						Ca As						
n=130	G	0.609	0.613	0.516	0.40 0.64	0.328	0.6	0.517	ND			
97.74%	C	0.391	0.386	0.483	0.61 0.36	0.672	0.4	0.483	ND			
NCSTN	rs12239747					Ca						
	n=126	A	0.967	0.938	0.95	0.96	0.951	0.94	0.712	0.95		
	94.74%	G	0.032	0.062	0.05	0.04	0.049	0.06	0.288	0.05		
	rs7528638					Ca		*Agilent	*low			
n=133	C	0.935	0.966	0.975	0.96	0.938	ND	0.949	ND			
100%	G	0.065	0.034	0.025	0.04	0.061	ND	0.051	ND			
APOE	rs405509					Ca As Af His						
	n=109	A	0.573	0.559	0.408	0.56 0.78 0.24 0.41	0.509	0.663	0.208	0.480		
	81.95%	C	0.426	0.441	0.591	0.44 0.22 0.76 0.59	0.491	0.337	0.792	0.520		
	rs429358					ε4		*low				
	n=133	T	0.663	0.925	0.850	Ca As Af His	0.908	1.0	0.983	ND		
	100%	C	0.337	0.074	0.150	0.38 0.28 0.35 0.24	0.092		0.017	ND		
APOE	rs7412					*low						
	n=133	C	1.0	0.925	0.916		0.933	0.905	0.905	0.939		
	100%	T	0	0.074	0.083		0.067	0.095	0.095	0.061		

Tabla 8. Comparación de frecuencias alélicas en diferentes poblaciones.

^aDatos tomados del proyecto 1000 Genomas, en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>, CLM=Colombianos residentes en Medellín

^bdatos tomados de www.alzgene.org Autor, Año; Ca=Caucásicos y As=Asiáticos, Af=Descendientes de africanos, His=Hispanos,

^cdatos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) tomados de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP> CEU=individuos residentes en Utah de ascendencia europea; HCB=individuos Chinos Han de Pekín; YRI=individuos Yoruba de Nigeria; MEX=Individuos residentes en Los Angeles de ascendencia mexicana, *CSAgilent= individuos de ascendencia europea y *low= individuos Yoruba del proyecto 1000 genomas, ND= sin datos.

El comportamiento de las frecuencias del marcador rs638405 de BACE1 es interesante ya que si bien se esperaría que fuera cercana a las reportadas en Alzgene en caucásicos, las frecuencias son más cercanas a las de la población con enfermedad de

Alzheimer de origen asiático, dato que debe ser tenido en cuenta en los posteriores análisis de asociación.

Con respecto a las frecuencias reportadas en HapMap, es interesante notar que la variación en las frecuencias establecidas para cada grupo poblacional hace referencia a la historia evolutiva de los grupos poblacionales, las migraciones, variación del entorno y consecuente variación de las frecuencias (*International HapMap Consortium, 2005; 1000 Genomes Project Consortium, 2010*). En la mayoría de marcadores estudiados las frecuencias son cercanas a las frecuencias reportadas para caucásicos (CEU) o en algunos casos para mexicanos (MEX), lo cual está en consonancia con la composición ancestral de la población estudiada. Sin embargo, para el marcador rs514049 de ADAM10, el marcador rs638405 de BACE1 y el marcador rs429358 de APOE las frecuencias difieren de la siguiente manera: en el primer caso las frecuencias de controles de Antioquia se asemejan a las de HapMap para mexicanos, sin embargo el alelo C tiene una frecuencia mayor en pacientes con respecto al reporte del mismo alelo para mexicanos; en el segundo marcador mencionado las frecuencias que se reportan aquí para la muestra estudiada de Antioquia son cercanas a las reportadas para HCB, esto es, el grupo poblacional asiático y cabe anotar que para este marcador no se han determinado datos en HapMap para la población mexicana, lo cual sería de utilidad en esta comparación. Para el marcador de APOE la frecuencia en pacientes con enfermedad de Alzheimer en Antioquia del alelo C es mucho mayor a la reportada para los tres grupos de HapMap (CEU, HCB y YRI) y no hay reportes para la población de mexicanos. Es interesante notar que los marcadores de NCSTN (rs12239747 y rs7528638), teniendo en cuenta los datos disponibles, no revisten mayor variación en las frecuencias alélicas entre los grupos poblacionales reportados en HapMap, los estudios en Alzgene, el reporte de CLM de 1000 genomas y las frecuencias determinadas para la población de Antioquia. Sin embargo, se refiere en la literatura que algunas variantes comunes, es decir, con una frecuencia superior al 5% pueden presentar una fuerte diferencia entre los grupos de ancestría común (como el caso de CLM y MEX) que puede haber sido dirigida por adaptación local entre otros fenómenos (*1000 Genomes Project Consortium, 2012*) tal como se observa en algunos marcadores del estudio.

La frecuencias alélicas de referencia para la población colombiana (CLM) del proyecto de los 1000 genomas, se obtuvieron mediante la selección de cuarenta tríos de colombianos procedentes de diferentes regiones del país que vivieran en Medellín, de tal manera que

se pudiera tener acceso a individuos que representaran la diversidad génica existente (A. Naranjo, comunicación personal). Debido a que la muestra escogida para este estudio está representada por individuos mayores, nacidos en Antioquia y cuyos ancestros proceden de esta misma región, la cual ha sido mencionada en estudios anteriores como una región aislada geográfica e históricamente, es posible observar algunos marcadores cuyas frecuencias alélicas difieren de las reportadas para CLM.

	Pacientes N=46 (34.59%)	Controles N=87 (65.41%)
Distribución de Alelos de APOE N° (%)		
ε 2	(0)	13 (7.5)
ε 3	61 (66.3)	148 (85)
ε 4	31 (33.7)	13 (7.5)

Tabla 9. Datos de la distribución de alelos de APOE.

La distribución de alelos del gen APOE en ambas poblaciones no presenta diferencia significativa para el alelo ε3 (valor p es 0.13), sin embargo para los alelos ε2 y ε4 si es significativa (valores p de 0.0062 y 4×10^{-5} respectivamente). Allen Roses reporta frecuencias para el alelo ε4 de 0.40 (Roses, 1996) y posteriormente, a partir de metaanálisis realizados para el foro de investigación en Alzheimer (*Alzheimer Research Forum*) y su base de datos Alzgene (Bertram, 2007), se publican frecuencias para cada grupo étnico estudiado. Las frecuencias halladas en la población de Antioquia para el alelo ε4 (0.33 para pacientes y 0.07 para controles) son ligeramente mayores en pacientes que las reportadas en asiáticos e hispanos (0.28 y 0.24 respectivamente) pero inferiores a las de caucásicos y poblaciones mixtas (0.38 y 0.45 respectivamente), lo cual podría corresponder a la composición ancestral de la población de Antioquia, conformada por un componente caucásico, amerindio y africano que fluctúa entre el 70, 15 y 15% respectivamente (G. Bedoya, comunicación personal). Adicionalmente, el modesto tamaño de la población de estudio podría explicar diferencias en las frecuencias halladas.

- Frecuencias genotípicas

Se realizaron análisis en los programas SNPStats y GenePop (Anexo P). Respecto a las frecuencias genotípicas, el marcador rs514049 en ADAM10 y el marcador rs638405 en BACE1 presentan sutiles diferencias en la distribución de cada genotipo, en el primero

los controles presentan una frecuencia menor del homocigoto para el alelo C y para el segundo es el heterocigoto el que predomina en el grupo control. Sin embargo, el valor es significativo sólo para el marcador en ADAM10 (valor p de 0.0218). Para los marcadores rs429358 y rs7412 de APOE las diferencias en las frecuencias genotípicas es más evidente y los valores p son significativos (Anexo P).

GEN	SNP	Genotipos	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS				
			Antioquia		Alzgene ^a		
			Alz	Ctrl	Alz	Ctrl	
ADAM10	rs17269348 n=133 100%	A/A	0.89	0.89	0.753	0.780	
		A/G	0.11	0.11	0.229	0.208	
		G/G	---	---	0.018	0.012	
	rs514049 n=114 85.71%	A/A	0.3	0.49	0.171	0.157	
		A/C	0.4	0.37	0.486	0.482	
		C/C	0.3	0.14	0.343	0.361	
	rs653765 n=129 96.99%	A/A	0.33	0.28	0.543	0.536	
		A/G	0.46	0.45	0.363	0.401	
		G/G	0.22	0.28	0.094	0.062	
BACE1	rs535860 n=133 100%	A/A	0.8	0.77	0.015	0.022	
		A/T	0.17	0.22	0.211	0.206	
		T/T	0.02	0.01	0.775	0.773	
	rs638405 n=130 97.74%				Ca As	Ca As	
		G/G	0.39	0.3			
		G/C	0.43	0.63	0.169 0.414	0.157 0.383	
		C/C	0.17	0.07	0.453 0.459	0.463 0.492	
				0.379 0.127	0.380 0.125		
NCSTN	rs12239747 n=126 94.74%	A/A	0.93	0.88	0.918	0.922	
		A/G	0.07	0.12	0.080	0.076	
		G/G	---	---	0.002	0.002	
	rs7528638 n=133 100%	C/C	0.87	0.93	0.914	0.922	
		C/G	0.13	0.07	0.085	0.076	
		G/G	---	---	0.002	0.002	
APOE	rs405509 n=109 81.95%				Ca As Af His	Ca As Af His	
		A/A	0.34	0.34	0.313 0.602 0.063 0.165	0.229 0.498 0.080 0.170	
		A/C	0.46	0.44	0.498 0.365 0.352 0.496	0.495 0.425 0.394 0.468	
		C/C	0.2	0.2	0.189 0.033 0.585 0.339	0.276 0.077 0.526 0.362	
	rs429358 n=133 100%	T/T	0.37	0.85			
		T/C	0.59	0.15	ϵ 4/4	ϵ 4/4	
			C/C	0.04	0	Ca As Af His	Ca As Af His
						0.145 0.092 0.167 0.066	0.020 0.007 0.036 0.022
rs7412 n=133 100%	C/C	1	0.85				
	C/T	0	0.15				
	T/T	0	---				

Tabla 10. Comparación de las frecuencias genotípicas.

Determinación para la población estudiada y reportes de la base de datos genética Alzgene. ^aDatos tomados de www.alzgene.org; Ca=Caucásicos y As=Asiáticos, Af=Descendientes de africanos, His=Hispanos,

Como se mencionó anteriormente, las diferencias entre los reportes para la población estudiada en Antioquia y los datos de la base de datos genética Alzgene pueden ser explicados en función al tamaño muestral estudiado, así como diferencias en la composición genética ancestral.

	Pacientes N=46 (34.59%)	Controles N=87 (65.41%)
Distribución de Genotipos N° (%)		
2/3	(0)	11 (13)
2/4	(0)	2 (2)
3/3	17 (37)	63 (72)
3/4	27 (59)	11 (13)
4/4	2 (4)	(0)

Tabla 11. Datos de la distribución de genotipos de APOE.

En la distribución de genotipos que configuran los alelos de APOE es interesante notar que en la población estudiada no se presentan individuos homocigotos para el alelo $\epsilon 2$; teniendo en cuenta que este alelo presenta frecuencia baja, este dato concuerda con lo reportado en algunas publicaciones (Corbo, 1999). El grupo de pacientes no posee representación respecto a la presencia de alelos $\epsilon 2$, que han sido determinados como protectores en algunas publicaciones, de la misma forma no se encuentran individuos control que sean homocigotos para el alelo $\epsilon 4$. El mayor porcentaje de individuos control es homocigoto para el alelo $\epsilon 3$ (72%), el cual es el alelo más común en la población, tal como se encuentra mencionado en algunas publicaciones realizadas en población colombiana (Arboleda, 2001, Forero, 2006c). Con respecto a la publicación de Arboleda en el 2001, los datos de la población estudiada son similares en el sentido de que no se encontraron, en el grupo de pacientes, portadores del genotipo 2/3, sin embargo, a diferencia de dicha publicación, en ésta no se reportan pacientes con genotipo 2/4 pero si individuos control, esto podría estar relacionado con un riesgo similar al del genotipo 3/3 que refieren algunos estudios.

El genotipo cuya diferencia entre grupos tiene un mayor valor p de significancia es el 3/4 con 6×10^{-8} y excepto por el genotipo 2/4, los demás presentan valores inferiores al dado por $\alpha=0.05$. Adicionalmente, la frecuencia del genotipo 3/4 en el grupo de pacientes de este estudio (0.59) es superior a la reportada en la base de datos de Alzgene para los grupos étnicos estudiados. Si bien la población estudiada es

considerada un aislado genético (Arcos-Burgos, 2002; Bedoya, 2006) este hallazgo podría también ser atribuido al tamaño muestral, por lo cual es importante validar estos datos en una muestra con la misma composición ancestral y de mayor tamaño.

- Estudios de asociación

El análisis de asociación en SNPStats está basado en una perspectiva de epidemiología genética, en la cual cada SNP es analizado en función a la variable definida como respuesta, en este caso el estatus de los individuos (pacientes y controles), y realiza una regresión logística estableciendo además distintos modelos de herencia, frecuencia de los genotipos, determina un valor p, los OR (*odds ratios*) y el intervalo de confianza (95%) (Solé, 2006) (Anexo Q).

Para la mayoría de marcadores estudiados los valores p, dados por un valor $\alpha=0.05$, no son significativos, sin embargo para el marcador rs514049 de ADAM10, bajo el modelo de herencia recesivo, el homocigoto C/C representa riesgo con un OR 2.64 (CI 1.04-6.72; valor p 0.04). Para el marcador rs638405 de BACE1, el heterocigoto G/C (modelo de comparación del heterocigoto contra ambos homocigotos) presenta un efecto protector con un OR 0.45 (CI 0.22-0.94; valor p 0.031), cuando se realiza el ajuste por la variable edad se observa el efecto protector del heterocigoto (OR 0.34 CI 0.15-0.78; valor p 0.0087) pero adicionalmente en el modelo recesivo el homocigoto C/C confiere riesgo con un OR 3.76 (CI 1.11-12.76; valor p 0.031) y este hallazgo se replica cuando se hace el ajuste por las variables edad, género y presencia del alelo 4 de APOE. Ajustes adicionales indican que este efecto no es modulado por variables como la escolaridad. Para el marcador rs429358 de APOE, en el modelo dominante se presenta riesgo al portar al menos un alelo C con un OR 9.71 (CI 4.19-22.50; valor p <0.0001) y al realizar el ajuste por las variables edad, sexo o escolaridad, la edad es la única variable que aumenta el riesgo (OR 12.42 CI 4.71-32.78; valor p <0.0001).

El programa PLINK permite realizar análisis de asociación genotípica, generando diferentes modelos, el valor de chi-cuadrado y valor p para cada uno (Anexo Q). Para el marcador rs514049 de ADAM10 el valor p más bajo se encuentra en el modelo de asociación alélica (valor p 0.0082), así como en los marcadores rs429358 y rs7412 de APOE (valores p de 4.37×10^{-5} y 0.0071 respectivamente). Adicionalmente, se encuentra un valor, que si bien no es significativo podría sugerir una tendencia en el modelo genotípico para el marcador rs638405 de BACE1 (valor p 0.057).

El análisis de asociación alélica realizado en PLINK permite determinar valores de chi-cuadrado, valor p, el OR y el intervalo de confianza de 95%. En éste, se encuentra que el marcador rs514048 de ADAM10 presenta un OR de 2.09 (1.20-3.62, valor p de 0.0083) para el alelo C; para el marcador rs429358 de APOE el alelo C presenta un OR de 6.29 (3.09-12.82; valor p 4.4×10^{-5}) y el marcador rs7412 de APOE presenta un valor p significativo de 0.0071, sin embargo, como no existen pacientes con el genotipo T/T no es posible determinar el OR.

Por otra parte, la presencia de al menos un alelo $\epsilon 4$ del gen de APOE genera un riesgo dado por un OR de 9.71 (CI 4.19 – 22.49, valor p < 0.0001) y la ausencia de este alelo $\epsilon 4$ en la población estudiada constituye un factor de protección dado por un OR 0.29 (CI 0.12 – 0.69, p de 0.0049).

GEN	SNP	A1	A2	Valor P	OR Antioquia	OR Alzgene *
ADAM10	rs17269348	G	A	0.9163	0.94(0.31–2.84)	1.15 (1.03 – 1.28) G vs A
	rs514049	C	A	0.0083	2.09(1.20- 3.62)	
	rs653765	G	A	0.403	0.80(0.48-1.34)	
BACE1	rs535860	T	A	0.772	0.89(0.39-1.98)	0.96 (0.80 – 1.17) A vs T
	rs638405	C	G	0.945	1.02(0.60-1.72)**	1.02 (0.93 – 1.11) G vs C
NCSTN	rs12239747	G	A	0.302	0.51(0.14-1.89)	0.99 (0.73 – 1.34) G vs A
	rs7528638	G	C	0.251	1.95(0.61-6.24)	1.07 (0.78 – 1.47) G vs C
APOE	rs405509	C	A	0.836	0.94(0.54-1.64)	0.73 (0.69 – 0.78) C vs T
	r429358	C	T	4.4e-5	6.29(3.09-12.82)	3.68 (3.30 – 4.11) 4 vs 3
	r7412	T	C	0.0071		

Tabla 12. Comparación de análisis de asociación alélica.

Alelo A1 y A2 para el estudio. Valor p de significancia. Valor del OR determinado para Antioquia y valor OR reportado en la base de datos de Alzgene. *Datos tomados de www.alzgene.org;

De los polimorfismos estudiados en ADAM10 el rs514049 tiene un valor p de significancia en los análisis de asociación. Este SNP se encuentra localizado en el promotor del gen, tal como fue determinado por Prinzen en el 2005 y se halla en una región de unión de factores de transcripción e islas CpG, lo cual podría modular su expresión y patrones de metilación. En estudios realizados en el 2011 y 2012 por Bekris no se encuentra diferencia en las frecuencias alélicas para este marcador, sin embargo los individuos control con genotipo homocigoto para el alelo C presentan mayores niveles de la fracción soluble de la proteína precursora amiloide (sAPP α) en líquido cefalorraquídeo, mientras que los pacientes con este genotipo presentan el efecto contrario, lo cual sugiere que la producción de APP α es diferente entre pacientes y controles y está asociada al alelo C de este polimorfismo. Dado que las frecuencias pueden variar en función a la

composición ancestral de la población estudiada y que en el estudio realizado en Antioquia se encuentra una mayor frecuencia del alelo C, se evidencia la validez de realizar estudios funcionales para observar el comportamiento de las fracciones de APP α y β en líquido cefalorraquídeo de estos individuos o realizar estudios respecto a los patrones de metilación del gen. Cabe destacar que ADAM10, que media el procesamiento de la proteína precursora amiloide por la vía no amiloidogénica podría constituirse en un blanco terapéutico de posteriores investigaciones, teniendo en cuenta los hallazgos encontrados en este estudio.

Respecto a los polimorfismos en el gen BACE1, el rs638405 presenta un efecto protector del heterocigoto, dato que es acorde con la publicación de Clarimón en 2003, sin embargo, el comportamiento del alelo de riesgo, teniendo en cuenta que la muestra analizada en la región de Antioquia tiene un alto componente ancestral caucásico presenta un comportamiento inusual, las publicaciones realizadas en individuos con esta composición reportan el alelo G como el de riesgo, mientras que luego de realizar los ajustes por algunas covariables, en el presente estudio se determina al alelo C como el que confiere riesgo. Una publicación reciente refiere diferentes patrones de procesamiento de la Proteína precursora amiloide en pacientes con la enfermedad de tipo autosómico dominante e individuos con enfermedad de Alzheimer esporádico, particularmente en lo referente al incremento en los niveles y actividad de BACE1 (Pera, 2013). Si bien el polimorfismo rs638405 es exónico y sinónimo, lo cual no podría explicar por sí mismo un incremento en la actividad, Nowotny en su estudio del 2001 postula que podría estar en desequilibrio de ligamiento con variantes intrónicas y pudiera modificar sitios de splicing. En este estudio se refiere un desequilibrio de ligamiento entre este marcador y el marcador intrónico rs535860, que podría sugerir un fenómeno como el sugerido por Nowotny, sin embargo, estos datos deberán ser replicados en una muestra de mayor tamaño y la hipótesis podría ser puesta a prueba en ensayos funcionales.

Respecto a los resultados encontrados para los polimorfismos de APOE, se corrobora el efecto de riesgo del alelo $\epsilon 4$ para esta población, si bien los valores de OR más altos que los reportados para poblaciones de características similares pueden sugerir un sesgo debido al tamaño de la muestra.

- Determinación de haplotipos

Los haplotipos hacen referencia a la combinación particular de nucleótidos en el mismo cromosoma observadas en las poblaciones y que proveen mayor información que los SNPs por separado, sobre la relación entre variaciones en el ADN y un fenotipo (Gabriel, 2002; Schaid, 2002); y se han utilizado en el diseño e interpretación de estudios de asociación. El desequilibrio de ligamiento (*Linkage disequilibrium*, LD), o “asociación no aleatoria de alelos en loci adyacentes” postula que cuando un alelo en un locus se encuentra junto con un alelo específico en un segundo locus de forma más frecuente a lo que se esperaría si los loci se segregaran de manera independiente, estos loci se encuentran en desequilibrio (Ardlie, 2002) y la medida más usada de éste es D (Lewontin, 1964 en Ardlie, 2002), la cual cuantifica el desequilibrio como la diferencia entre la frecuencia observada de un haplotipo y la frecuencia esperada si estos alelos se segregaran de forma independiente. Alternativamente, otras medidas empleadas para medir el desequilibrio de ligamiento son D' y r^2 y se establece que cuando $D'=1$ los dos SNPs no han sido separados por recombinación y están en completo LD, sin embargo esta medida está influenciada por el tamaño de la muestra, razón por la cual suele emplearse la medida de r^2 que cuantifica la correlación de los alelos en los dos sitios, así $r^2=1$ solo si los marcadores no han sido separados por recombinación y tienen la misma frecuencia alélica (Ardlie, 2002). Sin embargo, muchos estudios han examinado el desequilibrio de ligamiento concluyendo que éste es extremadamente variable entre loci y entre poblaciones (Gabriel, 2002).

Para el presente trabajo se realizaron análisis en los programas SNPStats y Haploview (Anexo R) para determinar haplotipos para los genes estudiados (un gen, un cromosoma) y para los marcadores genotipificados formando un bloque Figura 1.8.

Dado que en Haploview los marcadores estudiados no forman un bloque haplotípico por defecto (teniendo en cuenta el algoritmo de Gabriel), se señalaron manualmente bloques para cada gen estudiado.

Se determinaron cuatro bloques de haplotipos, el bloque correspondiente a ADAM10 se localiza a lo largo de 217kb, mientras que los bloques para APOE, BACE1 y NCSTN fluctúan entre 2 y 3 kb. En cada bloque se determinan los haplotipos, las frecuencias totales y entre grupos y una prueba de chi-cuadrado (χ^2) (Anexo R).

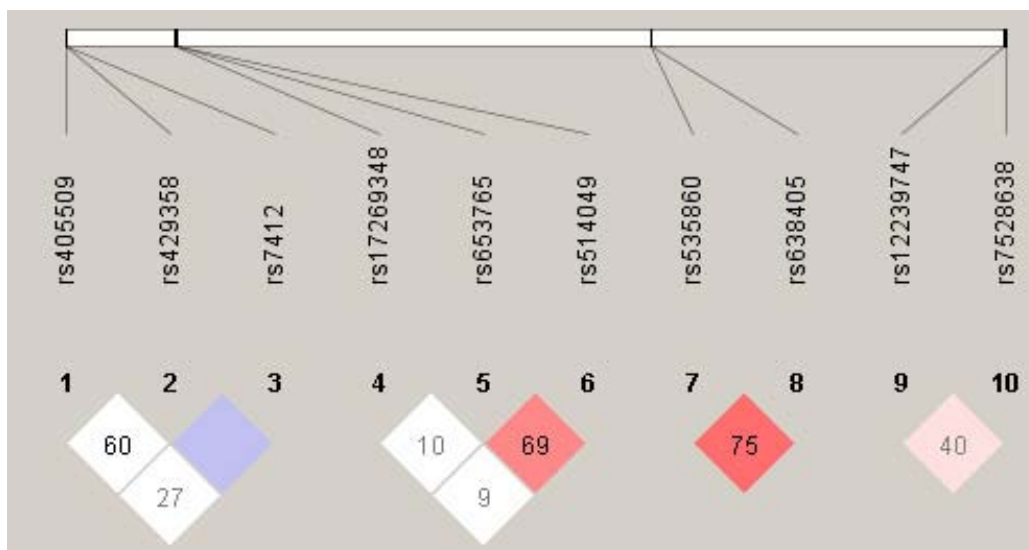


Figura 1.8 Estructura y valores de LD generado en Haploview para los marcadores estudiados. De izquierda a derecha se encuentran los tres marcadores para APOE (cromosoma 19), tres para ADAM10 (cromosoma 15), dos para BACE1 (cromosoma 11) y dos para NCSTN (cromosoma 1). Se muestra el esquema de color estándar (D'/LOD) en el cual el color rojo más intenso representa valores más altos de D' mientras que el color blanco representa menores valores de D'. El tono azul representa un valor alto de D' con un bajo LOD. Los valores numéricos representan el valor de D'.

Tomando un valor $\alpha=0.05$ se determina el valor p de significancia y se calculan los OR para estos haplotipos. En ADAM10 el haplotipo AAC conformado por los marcadores rs17269348, rs653765 y rs514049 presenta un valor p de 0.056 y un OR de 1.65 (CI 0.97 – 2.79). En NCSTN el haplotipo AG formado por los marcadores rs12239747 y rs7528638 presenta un valor p de 0.0274, si bien representa un haplotipo poco común genera un riesgo dado por un OR de 4.94 (CI 0.93 – 25.99). En APOE, los haplotipos formados por los marcadores rs405509, rs429358 y rs7412 presentan valores de significancia en varios haplotipos: el ATC y CTT serían protectores con OR 0.48 (CI 0.28 – 0.83), mientras que los haplotipos ACC y CCC presentan OR de 5.52 (CI 2.57 – 11.87) y 6.0 (CI 1.18 – 30.35) respectivamente.

Posteriormente se configura un bloque de haplotipos que contiene todos los marcadores (Anexo R), se encuentran valores significativos para los haplotipos ACCAACAGAC y ACCAGAAGAC que presentan un OR de 5.42 (CI 1.40 – 20.99) y 3.90 (CI 0.70 – 21.75) respectivamente.

Cuando se configura un bloque de haplotipos para todos los marcadores excepto los de APOE, los resultados son no significativos. Adicionalmente se conforman bloques de haplotipos entre el marcador rs429358, que determina la presencia de al menos un alelo ϵ_4 , y cada gen (Anexo R). Para el bloque formado con ADAM10 se encuentran tres

haplotipos con valores de significancia inferiores al $\alpha=0.05$: el TAGA, con un OR de 0.50 (CI 0.28 – 0.88), el CAAC con OR de 8.22 (CI 2.94 – 22.97) y el CAGA con un OR de 4.12 (CI 1.36 – 12.45) lo cual implicaría que tener un alelo T en el marcador de APOE genera protección, y de los alelos de ADAM10 el C en la última posición aumenta el riesgo. El bloque de haplotipos de BACE1 no genera respuesta significativa, sin embargo, en esta combinación con el marcador rs429358 se genera un haplotipo de protección y uno de riesgo: el TAG con un OR de 0.48 (CI 0.29 – 0.81) y el CAC con un OR de 5.18 (CI 1.57 – 17.02) y se comprueba el efecto de riesgo del alelo C determinado anteriormente. Para el bloque de rs429358 y NCSTN ocurre algo similar generándose dos haplotipos uno de protección y uno de riesgo así: el haplotipo TAC con un OR de 0.29 (CI 0.14 – 0.47) y el CAC con un OR de 5.70 (CI 2.78 – 11.66). Esta situación podría ser explicada por el efecto del marcador que configura el alelo en APOE, sin embargo, estos resultados deben ser validados en una muestra con composición ancestral similar de mayor tamaño que le confiera un mayor poder.

5 Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones y Recomendaciones

La enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico es un desorden neurodegenerativo complejo en el cual confluyen vías moleculares y celulares que producen un desenlace cuya presentación clínica es altamente heterogénea, y tiene componentes genéticos y ambientales que no han sido determinados claramente. En este estudio se realizó la caracterización de un grupo poblacional de composición ancestral particular y se estudiaron variaciones de un solo nucleótido con el fin de determinar su relación con la enfermedad.

La caracterización demográfica permitió determinar algunas variables que podrían estar asociadas a la presentación de la enfermedad y que son diferentes entre pacientes e individuos control.

Se caracterizaron tres polimorfismos de nucleótido simple en el gen ADAM10, dos polimorfismos en el gen BACE1, dos polimorfismos en el gen NCSTN y tres polimorfismos en el gen APOE en 46 pacientes con enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico y 87 individuos sanos, determinados como controles, provenientes de la región de Antioquia. Se excluyeron del estudio dos polimorfismos en el gen APOE por inconvenientes técnicos y un polimorfismo en el gen NCSTN por un bajo porcentaje de genotipificación (control de calidad).

Debido a que este es un estudio preliminar por factibilidad, el tamaño muestral es reducido, se recomienda ampliar el tamaño de muestra a aquellos pacientes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico cuya historia clínica pueda presentar mayor variación respecto al espectro clínico al inicio de la enfermedad sin limitarse a los pacientes con un claro déficit mnésico como característica única.

Las frecuencias alélicas y genotípicas determinadas en este estudio permitieron realizar comparaciones con distintos grupos poblacionales y pacientes de distinto origen étnico. El riesgo o protección frente a la enfermedad, dado por la frecuencia en las variaciones de nucleótido simple (SNPs) en los polimorfismos estudiados, podría estar modulada por la composición genética ancestral del grupo estudiado y por tanto, variar entre

poblaciones de distinto origen. Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas para el factor de riesgo de APOE, determinando un OR superior al reportado en otras publicaciones.

El análisis de asociación alélica para los marcadores estudiados permite determinar un OR de 2.09 (CI 1.20 - 3.62, p 0.0083) para el alelo C del marcador rs514049 de ADAM10 y un OR de 6.29 (CI 3.09 – 12.82, p 4.4×10^{-5}) para el alelo C del marcador rs429358 de APOE. El análisis de asociación genotípica permite determinar para el marcador rs514049 de ADAM10 en el modelo recesivo un OR de 2.64 (CI 1.04 – 6.72, p 0.04), para el marcador rs429358 en APOE en el modelo dominante (al menos un alelo C) un OR de 9.71 (CI 4.19 – 22.50, p < 0.0001) para el homocigoto C/C y un OR de 0.45 (CI 0.22 – 0.94, p 0.031) para el heterocigoto C/G del marcador rs638405 de BACE1. El análisis de haplotipos permite determinar el AAC en ADAM10, el AG en NCSTN y el ACC en APOE como haplotipos de riesgo y el ATC y CTT en APOE como haplotipos de protección.

Si bien este estudio representa el primer reporte para Colombia de las frecuencias de los marcadores estudiados en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE, teniendo en cuenta la hipótesis funcional de su papel en el procesamiento de la proteína precursora amiloide y aclaramiento del péptido β amiloide, es claro, tal como refieren algunos autores, que estos genes no confieren un riesgo mayor para la enfermedad de Alzheimer y su contribución, teniendo en cuenta que es ésta una enfermedad compleja, debe ser de tipo aditivo a otros factores genéticos y ambientales.

6 Limitaciones, Aportes y Perspectivas

Limitaciones, aportes y perspectivas

La principal limitación del presente estudio es el tamaño de la muestra estudiada, puesto que los hallazgos aquí reportados deben ser validados en una muestra con poder suficiente para generar resultados concluyentes respecto a las variaciones de nucleótido simple en los genes estudiados. También se configuran como limitantes los posibles sesgos de detección y/o diagnóstico de los pacientes escogidos para el estudio, el criterio referente al componente mnésico como síntoma principal permite que el grupo estudiado sea más homogéneo para la determinación de variantes genéticas, pero incide en el reducido tamaño del grupo, dada la heterogeneidad en la presentación de los primeros síntomas.

Si bien se puede pensar que el criterio de exclusión de individuos pertenecientes a otras regiones del país puede ser una limitante del tamaño de muestra, el argumento que respalda esta elección hace referencia a las publicaciones que reportan esta región como un aislado genético, lo cual representa que sea un candidato idóneo para este tipo de estudios.

Con respecto al estado del arte en el estudio de la enfermedad de Alzheimer, se sabe que la generación del péptido β amiloide a partir de la proteína precursora amiloide (APP) involucra la acción de la β secretasa y la γ secretasa. Por otra parte, la vía no amiloidogénica, que implica el corte por la α secretasa evita la producción del β amiloide. El aporte de este trabajo al conocimiento sobre la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico permite señalar que variaciones en el genoma de los individuos estudiados, pertenecientes a un grupo considerado como aislado genético, podrían estar incidiendo en la expresión de la proteína, así como en la posterior interacción de la misma con la APP. De manera particular, polimorfismos en el promotor de ADAM10, cuyas frecuencias difieren entre pacientes y controles, podrían estar implicados en los niveles de expresión y su acción en la vía no amiloidogénica. Si bien publicaciones anteriores no han encontrado asociación significativa entre estos polimorfismos y la enfermedad de Alzheimer en poblaciones con composición ancestral específica, vale la pena destacar que las asociaciones encontradas en este grupo poblacional indican la importancia de realizar estudios funcionales de estas variaciones en el genoma y permiten plantear

preguntas relacionadas con el uso de ADAM10 como posible blanco terapéutico para el tratamiento de la enfermedad. El estudio de estos genes, asociados a marcadores biológicos de la enfermedad (fracciones solubles de APP α y β en líquido cefalorraquídeo), permitirá una mayor comprensión de los eventos celulares que generan el péptido β amiloide, principal componente de las placas neuríticas.

Como perspectivas generadas a partir de este estudio se plantea aumentar el tamaño muestral mediante la inclusión de un número mayor de individuos con enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico provenientes de la región de Antioquia e incluir un mayor número de individuos control para realizar un estudio de variantes genéticas que pudieran ser informativas de rutas metabólicas y otros sistemas implicados en la enfermedad.

Adicionalmente se plantea la posibilidad de realizar estudios funcionales a partir de muestras de pacientes de la región o emplear modelos celulares que permitan determinar la contribución de las variantes estudiadas al proceso de la enfermedad.

Anexos

A. Criterios para el diagnóstico clínico de Enfermedad de Alzheimer

I.	Los criterios para el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer PROBABLE incluyen Demencia establecida por examen clínico y documentada con la prueba de MiniMental (MMSE, MiniMental State Examination Folstein, 1975 en McKhann, 1984), la escala de Demencia de Blessed (Blessed, 1968 en McKhann, 1984) o algún examen similar y confirmada por pruebas neuropsicológicas; Déficit en 2 o más áreas cognitivas; Empeoramiento progresivo de memoria y otras funciones cognitivas Sin deterioro de conciencia Aparición entre 40 y 90 años, usualmente después de los 65 años; y Ausencia de enfermedades sistémicas u otras enfermedades cerebrales que puedan dar cuenta de los déficits progresivos en memoria y cognición.
II.	Diagnóstico de PROBABLE soportado por Deterioro progresivo de funciones cognoscitivas específicas como lenguaje (afasia), habilidades motoras (apraxia), y percepción (agnosia); Impedimento en actividades de la vida cotidiana y patrones alterados de conducta; Historia familiar de desórdenes similares, particularmente si están confirmados neuropatológicamente; y Resultados de laboratorio de: - Punción lumbar normal evaluada por técnicas estandarizadas, - Patrones normales o cambios no específicos en EEG, como un incremento en la actividad de ondas cortas, y - Evidencia de atrofia cerebral en Tomografía computarizada con progresión documentada por observaciones seriadas.
III.	Otras características clínicas consistentes con el diagnóstico de PROBABLE, después de la exclusión de otras causas de demencia, incluyen: Mesetas en el curso de progresión de la enfermedad Síntomas asociados de depresión, insomnio, incontinencia, delusiones, ilusiones, alucinaciones, arrebatos verbales, emocionales o físicos, desórdenes sexuales y pérdida de peso; Otras anomalías neurológicas en algunos pacientes, especialmente con una enfermedad más avanzada e incluye signos motores como el incremento en el tono muscular, mioclonía o trastorno en la marcha; Convulsiones en pacientes en estado avanzado; y Tomografía computarizada normal para la edad.
IV.	Características que hacen el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer PROBABLE incierto Aparición súbita Hallazgos neurológicos focales como hemiparesia, pérdida sensorial, déficits en el campo visual, descoordinación temprana en el curso de la enfermedad; y Convulsiones o trastornos en la marcha en el inicio o muy tempranamente en el curso de la enfermedad.
V.	Diagnóstico clínico de Enfermedad de Alzheimer POSIBLE Puede ser realizado con base en el síndrome demencial, en ausencia de otros desórdenes neurológicos, psiquiátricos o sistémicos suficientes para causar demencia, y en presencia de variaciones en el inicio, en la presentación o en el curso clínico; Puede ser realizado en presencia de un desorden sistémico o cerebral secundario suficiente para causar demencia, el cual no es LA causa de la demencia; y Puede ser utilizado en estudios de investigación cuando un déficit cognitivo severo gradualmente progresivo es identificado en ausencia de otra causa identificable.
VI.	Criterios para el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer DEFINITIVO Los criterios clínicos para Enfermedad de Alzheimer probable y Evidencia histopatológica obtenida de una biopsia o autopsia identificable.
VII.	Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer para Investigación debe especificar características que podrían diferenciar subtipos como Ocurrencia familiar; Aparición antes de los 65 años; Presencia de trisomía del cromosoma 21 y Coexistencia de otras condiciones relevantes como Enfermedad de Parkinson.

Modificado de McKhann, 1984.

B. Tipos comunes de demencia y sus principales características

Tipo de Demencia	Características
Enfermedad de Alzheimer	<p>Tipo de demencia más común, entre el 60 y 80% de los casos.</p> <p>Dificultad en recordar nombres y eventos recientes, como síntoma inicial, también apatía y depresión. Síntomas posteriores incluyen deterioro en el juicio, desorientación, confusión, cambios comportamentales entre otros. Los nuevos criterios recomiendan que es una enfermedad que empieza antes del desarrollo de síntomas.</p> <p>Anormalidades cerebrales: depósitos en forma de placas del péptido amiloide y ovillos de la proteína tau, así como evidencia de daño neuronal y muerte.</p>
Demencia Vascular	<p>Previamente conocida como demencia multiinfarto, es menos común que el Alzheimer.</p> <p>Juicio deteriorado o habilidad de planificar como síntomas iniciales, en contraposición con la pérdida de memoria del Alzheimer.</p> <p>Ocasionada por daños cerebrales por microhemorragias y bloqueo de vasos sanguíneos. Su localización determina el tipo de deterioro. Anteriormente la evidencia de demencia vascular fue utilizada para excluir el Alzheimer, sin embargo, la evidencia patológica muestra que los cambios cerebrales de ambos tipos de demencia pueden presentarse simultáneamente, cuando esto ocurre se considera que el paciente tiene demencia mixta.</p>
Demencia por cuerpos de Lewy	<p>Los pacientes tienen algunos de los síntomas del Alzheimer, pero es más frecuente que tengan anomalías en el sueño, alucinaciones visuales complejas, rigidez muscular u otras características parkinsonianas.</p> <p>Los cuerpos de Lewy son agregaciones anormales de la proteína alfa-sinucleína. Cuando se desarrollan en el córtex puede producirse demencia. Esta proteína también se acumula en Parkinson, pero el patrón de distribución es diferente.</p> <p>Estos cambios causan demencia, pero cuando se presentan al mismo tiempo que los de Alzheimer o demencia vascular se considera que el paciente tiene demencia mixta.</p>
Demencia del Lóbulo Frontotemporal	<p>Incluye demencia con la variante comportamental de la demencia frontotemporal, afasia primaria progresiva, Enfermedad de Pick y parálisis supranuclear progresiva.</p> <p>Los síntomas típicos incluyen cambios en la personalidad y conducta y dificultades con el lenguaje.</p> <p>Las células nerviosas de las regiones frontales y laterales del cerebro están especialmente afectadas.</p> <p>Los cambios cerebrales pueden estar presentar al mismo tiempo que los de Alzheimer, pero los pacientes generalmente desarrollan síntomas a una edad más temprana (60 años) y su supervivencia es menor que en el Alzheimer.</p>
Demencia mixta	<p>Caracterizada por las anomalías de Alzheimer y otro tipo de demencia que puede ser vascular o por cuerpos de Lewy.</p>
Enfermedad de Parkinson	<p>Con la progresión de la enfermedad puede presentarse demencia similar a Alzheimer o Cuerpos de Lewy.</p> <p>Los problemas de movimiento son el síntoma común inicial de la enfermedad. Los agregados de alfa-sinucleína inician en la sustancia nigra y se piensa que producen neurodegeneración de las células que producen dopamina. La incidencia de ésta es aproximadamente una décima parte de Alzheimer.</p>
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	<p>Enfermedad rápidamente fatal que deteriora la memoria y la coordinación y causa cambios comportamentales.</p> <p>Producida por una proteína infecciosa mal plegada (prion) que causa que otras proteínas en el cerebro cambien su plegamiento y dejen de funcionar.</p> <p>Se cree que una variante de esta enfermedad es causada por el consumo de productos vacunos infectados por la enfermedad de las vacas locas.</p>
Hidrocefalia de presión normal	<p>Los síntomas incluyen la dificultad en la marcha, pérdida de memoria e inhabilidad para el control vesical.</p> <p>Es causada por la acumulación de fluido en el cerebro.</p> <p>Puede ser corregida en algunos casos mediante una derivación quirúrgica para drenar el exceso de líquido</p>

Modificado de Thies, 2013.

C. Cambios neuropatológicos en la Enfermedad de Alzheimer

Método

Regiones cerebrales*.

El método preferido para placas de β Amiloide es la inmunohistoquímica para $A\beta$, y para ovillos es la inmunohistoquímica de tau τ o tau fosforilada (Braak, 2006 en Hyman, 2012) (aunque puede usarse thioflavina S o tinciones histoquímicas sensibles de plata) (modificado de Braak, 1991 en Hyman, 2012). El método preferido para las placas neuríticas en la thioflavina S o la técnica modificada de Bielschowsky, como recomienda el protocolo del CERAD (Mirra, 1991 en Hyman, 2012). Es esencial para el puntaje de neuríticas sólo las placas que muestren neuritas distróficas; las placas difusas no deben ser incluidas. Note que las pruebas inmunohistoquímicas para los procesos neuríticos como la proteína precursora amiloide, ubiquitina, neurofilamentos o tau fosforilada, pueden identificar subtipos de neuritas distróficas específicas, y parcialmente superpuestas que pueden diferir en la relevancia de la enfermedad (Dickson, 1997 en Hyman, 2012).

Clasificación

El cambio neuropatológico de la enfermedad de Alzheimer debe ser clasificado en tres parámetros (Amiloide, Braak, Cerad) para obtener la "Puntuación ABC"

A Puntuación de placas de β amiloide

A0: no hay placas amiloides o β amiloide (modificado de Thal, 2002 en Hyman, 2012)

A1: Thal fase 1 o 2

A2: Thal fase 3

A3: Thal fase 4 o 5

B. Estadio de ovillos neurofibrilares (modificado de Braak, 1991 en Hyman, 2012 o inmunohistoquímica de tau fosforilada Braak, 2006 en Hyman, 2012)

B0: no hay ovillos neurofibrilares

B1: Estadio Braak I o II

B2: Estadio Braak III o IV

B3: Estadio Braak V o VI

C. Puntuación de placas neuríticas (modificado del CERAD, Mirra, 1991 en Hyman, 2012)

C0: no hay placas neuríticas

C1: Escasas CERAD

C2: Moderadas CERAD

C3: Frecuentes CERAD

Nota: Un método alternativo que asesora la acumulación progresiva de depósitos de β amiloide únicamente en las estructuras del lóbulo temporal medio está correlacionado con las fases de Thal, se recomiendan las fases de Thal con los estudios de neuroimagen. Aunque la angiopatía amiloide cerebral y capilar no se considera en esta clasificación, debe ser reportada (como el sistema de Vonsattel, 1991 en Hyman, 2012) y la asociación con el alelo ϵ 4 de la Apolipoproteína E (Thal, 2008 en Hyman, 2012)

Reportes

Para todos los casos, independientemente de la historia clínica, el reporte debe seguir el formato de estos ejemplos:

"Cambios neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer: A1, B0, C0" o

"Cambios neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer: A3, B3, C3"

La puntuación ABC se transforma en uno de los cuatro niveles de cambios neuropatológicos: ninguno, bajo, intermedio y alto.

Nota: Es importante reconocer que la evaluación patológica puede ser aplicada a muestras de cirugía como también de autopsia, sin embargo, la evaluación regional puede estar limitada en muestras de biopsias. No obstante, la participación de ovillos neurofibrilares en el neocórtex indica B3, mientras que la participación de depósitos de β Amiloide indica A1 o posiblemente un puntaje superior. En estas circunstancias, el puntaje de placas neuríticas puede ser especialmente importante.

Correlación clinicopatológica

Individuos sin impedimento cognitivo en el momento en que fue obtenido el tejido, es posible que el cambio neuropatológico de Alzheimer pueda preceder la aparición de síntomas por años.

Individuos con impedimento cognitivo en el momento en que fue obtenido el tejido, con cambio neuropatológico "Intermedio" o "Alto" podrían ser considerados una explicación adecuada del deterioro cognitivo o la demencia. Cuando el cambio observado es "bajo" y existe deterioro, pueden estar presentes otras enfermedades.

En todos los casos con deterioro cognitivo, sin tener en cuenta el cambio neuropatológico de Alzheimer, es esencial determinar la presencia o ausencia, así como la medida, de otra enfermedad que pueda haber contribuido al déficit clínico.

En casos con historia clínica incompleta, un estudio clínico-patológico completo indica que los altos niveles de cambio neuropatológico típicamente están correlacionados con mayor probabilidad de deterioro cognitivo.

*Entre otras: Medula incluyendo núcleo motor dorsal del vago, Protuberancia incluyendo locus cerúleo, Mesencéfalo incluyendo sustancia nigra, Córtez cerebelar y núcleo dentado, Tálamo y núcleo subtalámico, Ganglio basal a nivel de la comisura anterior con núcleo basal de Meynert, hipocampo y corteza entorrinal, Cingulado anterior, amígdala, giro frontal medio, giro temporal superior y medio, lóbulo parietal inferior, córtex occipital (áreas de Brodmann 17 y 18), sustancia blanca en la arteria cerebral media, arteria media cerebral, y cuenca de la arteria cerebral posterior,

Modificado de Hyman, 2012.

D. CIE-10. Clasificación Estadística Internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud.

Hace referencia al uso de los capítulos V Trastornos mentales y del comportamiento (F00-F99) y VI Enfermedades del Sistema Nervioso (G)

Apartes empleados para discriminar criterios de inclusión y exclusión

F00-F09 TRASTORNOS MENTALES ORGANICOS, INCLUIDOS LOS TRASTORNOS SINTOMATICOS F00* Demencia en la enfermedad de Alzheimer (G30.-) F00.0* Demencia en la enfermedad de Alzheimer de comienzo temprano EXCLUSIÓN F00.1* Demencia en la enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío F00.2* Demencia en la enfermedad de Alzheimer atípica o de tipo mixto EXCLUSIÓN F00.9* Demencia en la enfermedad de Alzheimer, no especificada
F01 Demencia vascular EXCLUSIÓN F02* Demencia en otras enfermedades clasificadas en otra parte EXCLUSIÓN F02.0* Demencia en la enfermedad de Pick EXCLUSIÓN F02.1* Demencia en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob EXCLUSIÓN F02.2* Demencia en la enfermedad de Huntington EXCLUSIÓN F02.3* Demencia en la enfermedad de Parkinson EXCLUSIÓN F02.4* Demencia en la enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana [VIH] EXCLUSIÓN F02.8* Demencia en otras enfermedades especificadas clasificadas en otra parte EXCLUSIÓN
F03 Demencia, no especificada
F06 Otros trastornos mentales debidos a lesión y disfunción cerebral, y a enfermedad física F06.7 Trastorno cognoscitivo leve
G30-G32 Otras enfermedades degenerativas del sistema nervioso G30 Enfermedad de Alzheimer G30.0 Enfermedad de Alzheimer de comienzo temprano EXCLUSIÓN G30.1 Enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío G30.8 Otros tipos de enfermedad de Alzheimer G30.9 Enfermedad de Alzheimer, no especificada

Modificado de OPS, 2003.

**E. Formato de consentimiento
informado para participar en el
estudio**

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO ESPORÁDICO EN ANTIOQUIA

Universidad Nacional de Colombia
Universidad de Antioquia

Investigador Principal: Rodrigo Pardo T.

Co-Investigadores: Carlos Andrés Villegas L y Mónica María Castañeda C.

Título del Proyecto: "Análisis de polimorfismos en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE en pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico en Antioquia"

ACTA DE APROBACION 11-10-376 CBEIH-SIU. ACTA DE EVALUACION No. 15 CE-126 COMITÉ DE ETICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Usted ha sido invitado a participar en una investigación dirigida por el Dr. Rodrigo Pardo Turriago y colaboradores.

Si este formulario de consentimiento contiene palabras que usted no entiende, por favor pida explicación a uno de los integrantes del grupo de investigación para que le resuelva todas las dudas. Antes de tomar la decisión de participar en esta investigación, lea cuidadosamente éste formulario de consentimiento y pida explicación al investigador, por cualquier inquietud que usted tenga.

Usted también podrá discutir su participación con los demás miembros de su familia o amigos antes de tomar una decisión.

¿Cuál es el propósito de este estudio?

Este estudio busca analizar algunas variantes (polimorfismos) en genes implicados en el procesamiento, agregación y degradación del péptido beta amiloide. Se trata de relacionar cambios en algunos genes que intervienen en una vía molecular relacionada con el desarrollo de la enfermedad, con la presencia de la Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico en el departamento de Antioquia.

¿En qué consiste su participación?

Se espera que su participación incluya el siguiente procedimiento:

Toma de datos demográficos y estado de salud general:

A los participantes en este estudio se les realizará una entrevista en la cual se tomarán datos demográficos y se realizarán preguntas sobre el estado de salud general.

Toma de sangre periférica:

A los participantes se les tomará del brazo una muestra de sangre de 15 ml, con el fin de extraer ADN (Acido Desoxirribonucleico) y hacer un análisis genético para comprobar si existen cambios en los genes ADAM10, BACE1, NCSTN y APOE, involucrados en la vía amiloide.

Uso de las muestras en investigaciones:

Su muestra de sangre se utilizará exclusivamente para los objetivos de este proyecto, es decir para el análisis de variantes genéticas en el ADN (Acido Desoxirribonucleico) de pacientes con Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico e individuos sanos de la población.

¿Podríamos compartir sus muestras y sus datos (solo con códigos numéricos) con investigadores que estén haciendo estudios en campos similares en la Universidad de Antioquia y en otros centros de investigación? Podríamos compartir sus muestras y datos con otros investigadores, pero ellos en NINGUN CASO recibirán su nombre ni ninguna otra forma de identificar la información.

SI _____ NO _____
Ponga su inicial

Si usted está de acuerdo en que una parte de la muestra de sangre sea almacenada para estudios futuros que puedan resultar en el desarrollo de nuevos productos, por favor firme en el espacio provisional si está de acuerdo. Ninguna de las muestras de sangre se utilizará en otros estudios si usted no está de acuerdo. Usted puede cancelar esta autorización si en el futuro desea cambiar de opinión y a partir de ese momento su muestra no se utilizará en ningún otro proyecto y será destruida.

Participante

Informante

¿Cuántos individuos participaran en este estudio?

En el presente estudio se busca incluir el ADN (Acido Desoxirribonucleico) de 30 individuos que cumplan los criterios del DSM IV para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer y 90 individuos sanos de la población general que serán tomados como controles.

¿Cuanto tiempo dura su participación?

Su participación en este estudio durará una (1) sesión en la cual se obtendrán datos demográficos y estado de salud general e incluirá la toma de la muestra de sangre periférica. Su participación terminará una vez se complete esta evaluación clínica y la toma de muestra de sangre.

¿Que sucederá durante la realización de los exámenes?

Será recibido por un médico, que le pedirá información para la elaboración de una historia clínica y posteriormente será atendido por un Auxiliar de enfermería o Enfermero quien obtendrá la muestra de sangre por venopunción.

La entrevista del médico y la toma de sangre periférica se realizarán en una sola ocasión si usted ha aceptado participar y ha sido incluido en el estudio.

¿Cuales son los posibles riesgos y efectos adversos que se pueden presentar por participar en la investigación?

1. Probables: Las preguntas personales para conocer su estado de salud actual e historia clínica familiar pueden ser tediosas y embarazosas. Usted puede discutir las con el entrevistador y puede decidir no responder a determinadas preguntas o no continuar con su participación. Tanto las respuestas como la información que usted suministre son confidenciales.

2. Poco probables: Usted puede experimentar ligeras molestias en el sitio de la extracción de la sangre. Algunas personas experimentan mareos o sensación de debilidad general tras la extracción de la muestra.

3. Raras: Las compañías de seguros podrían considerar que participar en una investigación genética significa que hay historia familiar de una condición genética.

4. Ciertas investigaciones genéticas pueden revelar que usted es portador de un trastorno genético. Esto puede significar que usted o miembros de su familia pueden tener una mayor probabilidad de desarrollar un trastorno o ser portadores.

Excepcionalmente podría haber riesgos no reconocidos previamente que pueden ocurrir.

Confidencialidad de la información:

Se tomarán todas las medidas razonables para proteger la confidencialidad de la información suministrada a la investigación y de la identidad del participante. Los resultados de la investigación son estrictamente confidenciales. No se entregará información de los resultados obtenidos durante la investigación a compañías de seguros ni a otras personas o instituciones sin su previa autorización. Todas las muestras serán codificadas para su uso, esto con el fin de prevenir que la persona que trabaje con la muestra conozca la identidad del paciente. Las personas fuera del proyecto de investigación nunca podrán relacionar los resultados de la investigación con los nombres de los participantes. La lista con los números codificados y los nombres se guardará separada de su historia clínica y solo el investigador principal y algunas personas del equipo tendrán acceso a ella.

Se tomarán medidas para proteger la confidencialidad de los registros y la identidad no será divulgada en ninguna publicación que resulte de este estudio. Ello con el fin de asegurarse que los derechos han sido protegidos en este proyecto. Los códigos para identificar a los participantes serán guardados en un computador, con acceso al investigador principal y serán guardados con encriptamiento dado por una clave de acceso, conocida solo por quienes sean autorizados y se hallan comprometidos con la confidencialidad de la información.

¿Cuales son los posibles beneficios?

Es posible que usted no reciba ningún beneficio directo por la participación. Sin embargo su colaboración en la investigación puede proporcionarnos conocimientos que ayuden a otras personas en el futuro.

¿Como será protegida su privacidad?

Ningún individuo será identificado en ningún reporte o publicación acerca de este estudio. Los grupos de Neurociencias de Antioquia y Genética Molecular de la Universidad de Antioquia tomarán todas la medidas para proteger la privacidad de la información personal. Las medidas tomadas incluirán el acceso restringido a la información a unos pocos integrantes de los grupos de investigación, los compromisos de confidencialidad, el encriptamiento de la información y el análisis ciego de la misma.

¿Le costará algo participar en este estudio?

A usted no se le cobrará por los diferentes estudios que se le realicen al ADN (Acido Desoxirribonucleico).

¿Quien financia este estudio?

Esta investigación está siendo financiada por la División de Investigación y la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Los investigadores no tienen un interés financiero directo con el patrocinador o con el resultado del estudio. El interés es estrictamente científico.

¿Que sucede si usted decide terminar su participación antes de que su parte en el estudio se haya completado?

Su participación en el estudio es voluntaria y usted puede negarse a participar, o retirar su participación en el estudio en cualquier momento. Si usted desea terminar su participación en este estudio, por favor solicítelo a los doctores Carlos Andrés Villegas L. o Rodrigo Pardo Turriago al teléfono: (4)2196444.

¿Que sucede si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como sujeto que participa en una investigación?

Esta investigación ha sido revisada y aprobada por el comité de ética de la sede de investigaciones universitarias (SIU) de la Universidad de Antioquia. Si usted tiene alguna pregunta o preocupación con respecto a sus derechos como sujeto de investigación, usted puede comunicarse con el jefe del comité de ética de la SIU. Dr. Oscar Osío Uribe al teléfono: 2633410. Si usted tiene alguna pregunta o preocupación con respecto a su participación en este proyecto, por favor consulte con los doctores Carlos Andres Villegas L. o Rodrigo Pardo Turriago al teléfono: (4)2196444.

Acuerdo del sujeto:

Yo he leído la información proporcionada previamente y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Entiendo que se me dará copia de este documento. Voluntariamente acepto participar en este estudio, que puede incluir: entrevista, obtención de datos y toma de muestra de sangre.

En constancia, firmo este documento de Consentimiento informado, en presencia del

Doctor _____ y dos testigos, en la ciudad de _____ el día _____ del mes de _____ del año _____.

Nombre, firma y documento de identidad del participante:

Nombre _____

Firma _____

Cédula de Ciudadanía N° de: _____

En caso de que el paciente no esté en condiciones de poder firmar:

Nombre, firma y documento de identidad del familiar y/o responsable por el paciente:

Nombre _____

Firma _____

Cédula de Ciudadanía N° de:

Grado de parentesco con el paciente:

Nombre, firma y documento de identidad del Investigador

Nombre _____

Firma _____

Cédula de Ciudadanía N° de:

Nombre, firma y documento de identidad del Testigo Número 1

Nombre _____

Firma _____

Cédula de Ciudadanía N° de:

Dirección _____

Grado de parentesco con el participante (si lo hay):

Nombre, firma y documento de identidad del Testigo Número 2

Nombre _____

Firma _____

Cédula de Ciudadanía N° de:

Dirección _____

Grado de parentesco con el participante (si lo hay):

Aprobado por el Comité de Bioética de la SIU, Universidad de Antioquia según Acta N° 11-10-376 del 19/08/2011

Este documento es válido solo con el sello de aprobación del Comité de Estudios Humanos.

Dr. Oscar Osío Uribe.

Presidente del comité de ética SIU, Universidad de Antioquia.

Acta de Evaluación No.15 CE-126. COMITÉ DE ETICA, FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**F. Concepto del comité de ética de
la Sede de Investigación
Universitaria (SIU), Universidad de
Antioquia**

COMITÉ DE BIOÉTICA SEDE INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA CBEIH-SIU

ACTA DE APROBACIÓN

ACTA DE APROBACION: 11-10-376

Nombre completo del proyecto: "Análisis de polimorfismos en los genes adam10, bace1, ncstn y apoe en pacientes con enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico en Antioquia"

Versión número: 01

Enmienda revisada: Ninguna

Sometido por: Dr. Andrés Villegas

Fecha en que fue sometido a consideración del comité: Agosto 19 de 2011

La SEDE DE INVESTIGACION UNIVERSITARIA constituyó mediante la Resolución 001 de Mayo 2 de 2005 de la Dirección Científica de la SIU el Comité de Bioética de investigación en Humanos CBEIH SIU, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre do 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Medica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, ultima revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, titulo 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

El CBEIH SIU certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- a. (X) Resumen del proyecto
- b. (X) Protocolo de investigación
- c. (X) Formato de consentimiento informado
- d. () Formato de recolección de datos
- e. () Folleto del investigador (si aplica)

f. () Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

Dr. OSCAR OSIO URIBE
Dr. ALBRTO RESTREPO
Dra. ROSALBA DURÁN
Dra. LUZ ELENA CASTRILLÓN
Dr. IVÁN DARÍO VÉLEZ

3. El Comité consideró que el presente estudio: es válido desde el punto de vista ético. La investigación implica un riesgo promedio para los sujetos que participan. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.

4. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
5. El Comité considera adecuada la forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio.
6. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
7. El Comité informará inmediatamente a las directivas de la SIU, toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación
 - b. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
 - c. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité
8. El presente proyecto ha sido aprobado por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.
Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente a este comité, con todos los documentos que permitan su revisión actualizada.
9. El Investigador principal deberá:
 - a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del CBEIH SIU excepto cuando sean necesarios para



UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA
1893

- minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica riesgos para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
 - c. Informar al Comité de cualquier evento adverso en los siguientes 15 días y de cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido el incidente.
 - d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
 - e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
 - f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
 - g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, deberán ser sometidos al CBEIH SIU nuevamente con todos sus documentos para actualizar su aprobación una vez transcurrido ese lapso de tiempo

10. Observación: Se recomienda completar la información alusiva a los testigos en el formato de Consentimiento informado, agregando: el grado de parentesco (si lo hubiere) y con su dirección, con la fecha en la cual se firma el consentimiento.

Nombre: OSCAR OSIO URBE

Título: Médico Internista. MSc. Epidemiología Clínica

Cargo CBEIH SIU: Presidente.

Nombre: ALEJANDRA JARAMILLO

Título: Comunicadora Social - Periodista

Cargo CBEIH SIU: Secretaria

**G. Concepto del comité de ética de
la Facultad de Medicina, Universidad
Nacional de Colombia**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA

ACTA DE EVALUACIÓN

CE - 126

ACTA DE EVALUACIÓN: No. 15

Fecha: 08 de septiembre de 2011

Nombre completo del proyecto: "ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES ADAM 10 BACE1, NCSTN Y APOE EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO ESPORÁDICO EN ANTIOQUIA".

Versión número: 01 revisada:

Sometido por: Mónica María Castañeda Cediel

Departamento: Maestría en Neurociencias

Fecha en que fue sometido a consideración del comité: 31 08 de 2011.

El COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991),

El Comité de Ética de la facultad de Medicina certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- a. Resúmen del proyecto
- b. Protocolo de investigación
- c. Formato de consentimiento informado
- d. Formato de recolección de datos
- e. Folleto del investigador (si aplica)
- f. Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

ciencia y tecnología para el país

Carrera 30 No. 45 03 FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471
Teléfono: Conmutador: 57 (1) 3185000 Ext. 15167
Bogotá, Colombia, Sur América

*Nota: Se envió por correo electrónico
Original enviado a la vicedecanatura investigación*

*14/09/11
15/09/11*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

Óscar García	Departamento de Ciencias Fisiológicas
Manuel José Jiménez	Miembro Externo de La Comunidad Científica
Carlos Guerrero	Ciencias Fisiológicas
Mercedes Mora	Miembro Externo de La Comunidad Científica (Excuso)

3. El Comité consideró que el presente estudio:

- Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio de la investigación y se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.
- El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos de investigación adecuadas.

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

6. El Investigador principal deberá:

- Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética, de acuerdo con la normatividad que el INVIMA a generado a este respecto.
- Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA

- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance entregado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio**.

Nombre: OSCAR A. GARCÍA VEGA

Título: Md; MSc, PhD

Cargo: Presidente COMITÉ DE ÉTICA

H. Diseño de primers

GEN	SNP	Primer F (5' a 3')	Primer r (5' a 3')
ADAM10	rs17269348	GACTAAATTCCCACACAAATGTTTC	TCCACTGCTGAAAATATTCCTAGAC
	rs514049	TAGTGCTCCGCTACGTGTTAGA	GCTGCCGCTATAAATTACTGCTT
	rs653765	AGGCCTCAGCAGCTCTAACAC	ACCTCCCTCTCGCTCCACTT
BACE1	rs638405	CAACATGATAACCAGAGTCTTCCTT	TTTTCCCTAGATCATTGGAGGTAT
NCSTN	rs12239747	CTTTCAGTGCTATCAAGATCACAAC	TCCCTATTACAGTCTCTCTAACATTCC
	rs7528638	AGGCTTGAGGGATAAAGGTCTACT	CAGCACCCTCTTCTCCAATGT
APOE	rs405509	AGAATGGAGGAGGGTGTCGG	ACTTGCCAATTATAGGGCTCC

Diseñados con el programa Primer3 v0.4.0 Rozen, 2000

I. Enzimas de restricción

GEN	SNP	Enzima de restricción	Condiciones	Secuencia de reconocimiento
ADAM10	rs17269348	Mun I (MfeI)	37°C 16h	5'...C↓A A T T G...3' 3'...G T T A A ↑C...5'
	rs514049	HpyCH4IV (Maell, Tai I)	65°C 16 h	5'...ACGT↓...3' 3'...↑TGC A ...5'
	rs653765	Bsp119 I (BstBI)	37°C 16h	5'...TT↓CGAA...3' 3'...A A G C ↑T T...5'
BACE1	rs638405	Bcl I	55° 16h *	5'...T↓GATCA...3' 3'...A C T A G ↑T...5'
NCSTN	rs12239747	HpyCH4 III (Taa I)	65°C 16h	5'...A C N ↓ G T...3' 3'...T G ↑ N C A ...5'
	rs7528638	BsaJ I (BseD I)	55°C 16h	5'...C↓C N N G G...3' 3'...G G N N C ↑C...5'
APOE	rs405509	Hpa II	37°C 16h	5'...C↓C G G...3' 3'...G G C ↑C...5'

Selección realizada con NEBcutter v2.0 de New England BioLabs Inc.

J. Amplificación de marcadores

Condiciones de Amplificación para los polimorfismos

GEN	SNP	Temperatura °C	[MgCl ₂]
ADAM10	rs17269348	58	2.0
	rs514049	61.9	1.5
	rs653765	53	2.4 + 10% DMSO ₄
BACE1	rs638405	56.3	2.0
NCSTN	rs12239747	55.4	2.4
	rs7528638	58.5	2.0
APOE	rs405509	58	2.4

Mezclas maestras para la amplificación.

Reactivo	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Agua	12.06	17.85	17.65
Buffer de reacción	1.5	2.5	2.5
MgCl ₂	0.45	1.0	1.2
dNTPs	0.3	0.5	0.5
Primer F	0.3	0.5	0.5
Primer rev	0.3	0.5	0.5
Taq pol	0.09	0.15	0.15
V _f	15µl	25µl	25µl

Mezcla 1 para Cloruro de Magnesio [1.5]. Mezcla 2 para [2.0]. Mezcla 3 para [2.4]

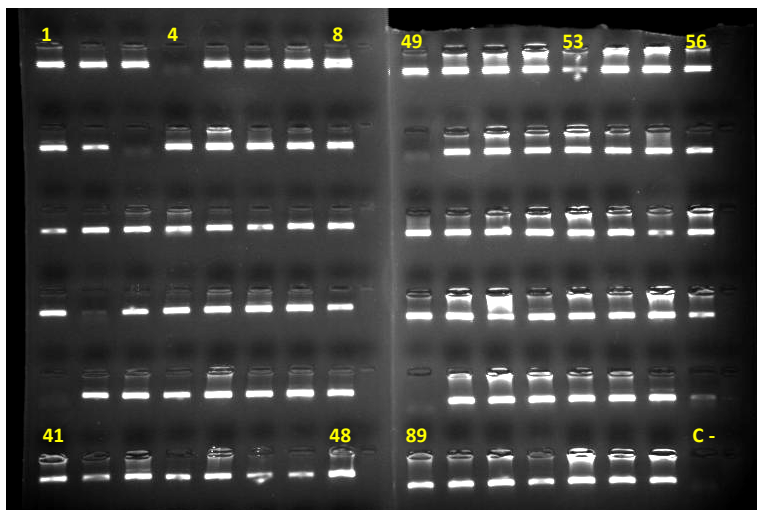
Perfil térmico para la amplificación:

Paso	Temperatura °C	Tiempo
Denaturación inicial	94	5 min
Denaturación	94	30 seg
Alineamiento	31 ciclos T° optimizada	45
Extensión		72
Extensión final	72	10 min
Conservación	4	indef

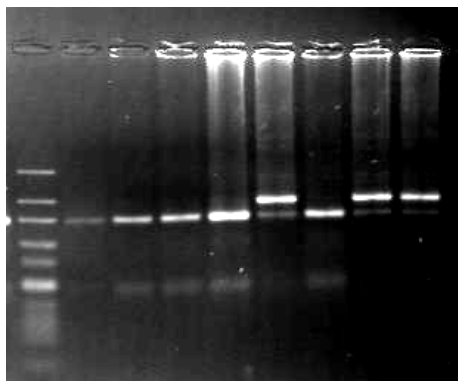
K. Amplicones y fragmentos de restricción

Amplicones

Amplificación del marcador NCSTN rs7528638, Agarosa 1.5% Plato 1



Patrón de bandas de restricción del marcador NCSTN rs7528638, Agarosa 3%. Muestras correspondientes al Plato 1.



L. Genotipificación por KASP™ (Kompetitive Allele Specific PCR)

1) Assay components:

A) Primer mix

Allele specific forward primers:

allele-1
5' ————— 3' C

allele-2
5' ————— 3' A

Reverse primer:
3' ————— 5'

B) Master mix

C) DNA template (sample)

2) Denatured template and annealing components – PCR round 1:

3) Complement of allele-specific tail sequence generated – PCR round 2:

Legend

- Allele-1 tail FAM™-labelled oligo sequence
- Allele-2 tail HEX™-labelled oligo sequence
- Common reverse primer
- F FAM™ dye
- H HEX™ dye
- G Target SNP
- Q Quencher

4) Signal generation – PCR round 3:

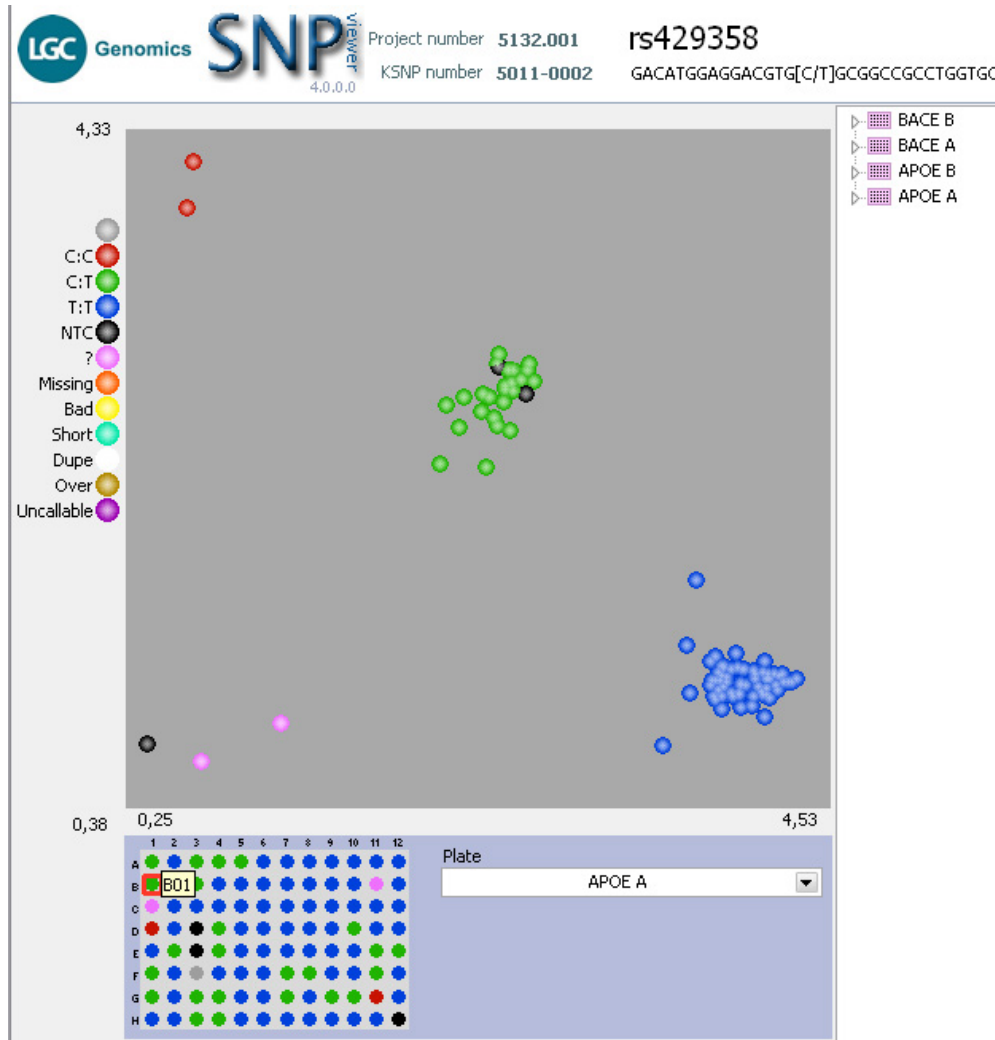
Thermal cycling results in exponential increase in allele-1 amplicon. As PCR continues, an increasing amount of FAM labelled oligo binds to the allele-1 amplicons. Fluorescence occurs as FAM labelled oligo is no longer quenched.

Fluor for incorporated G allele no longer quenched.

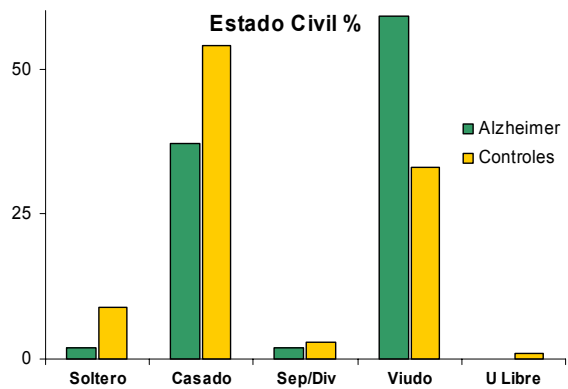
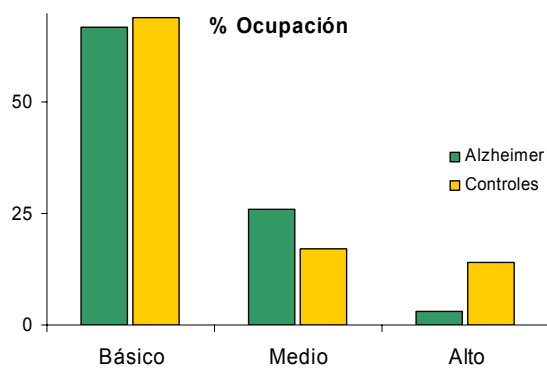
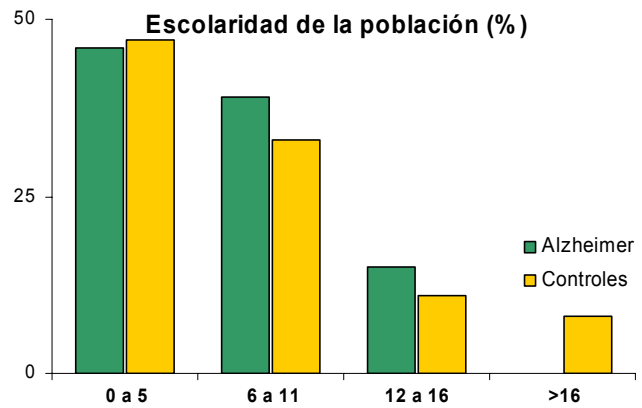
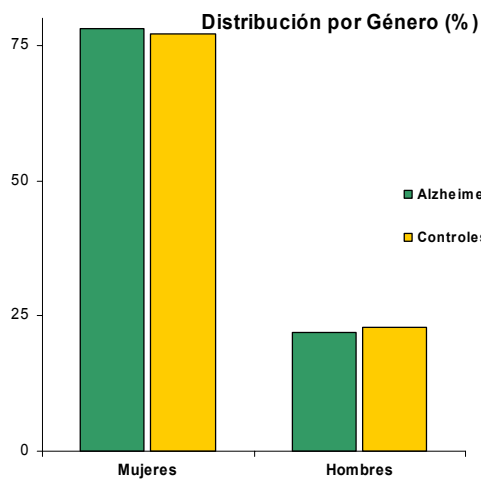
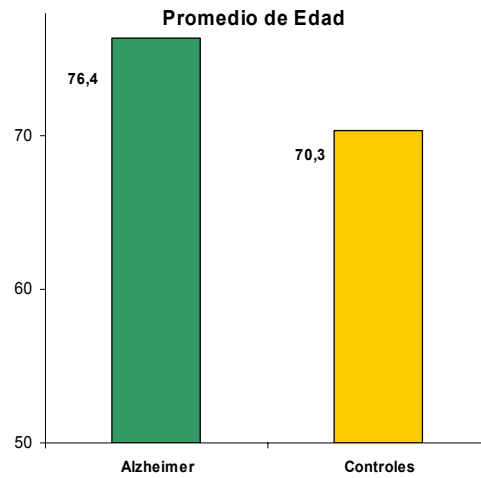
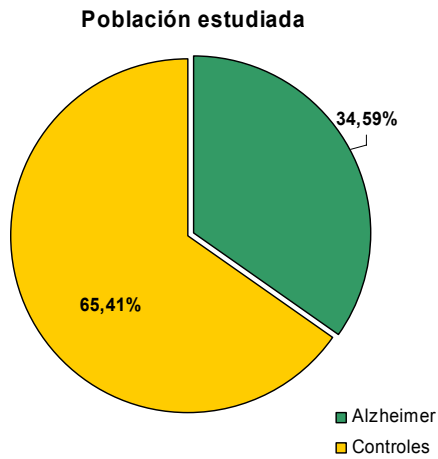
Fluor for non-incorporated T allele remains quenched.

Allelic discrimination achieved through competitive annealing of two allele-specific forward primers, each containing a unique tail sequence that corresponds with a distinctly labelled FRET cassette in the master mix.

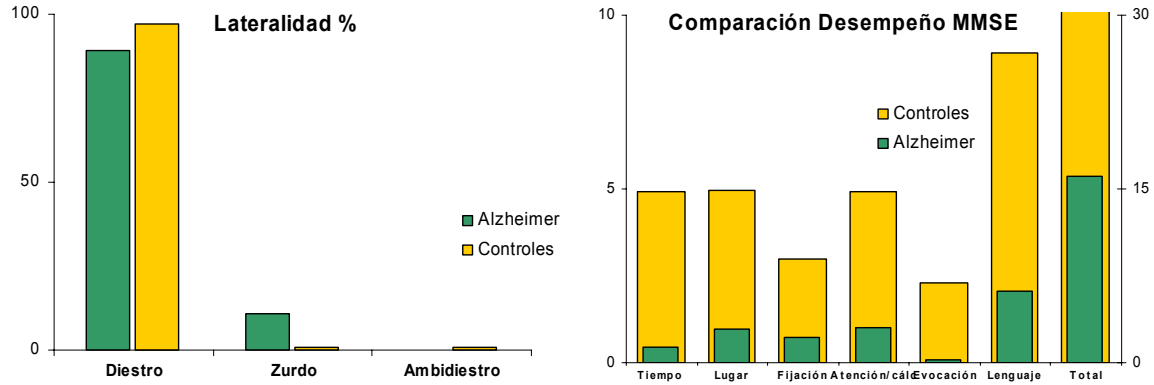
Resultado de la genotipificación del marcador APOE rs429358 por KASP™



M. Descriptores

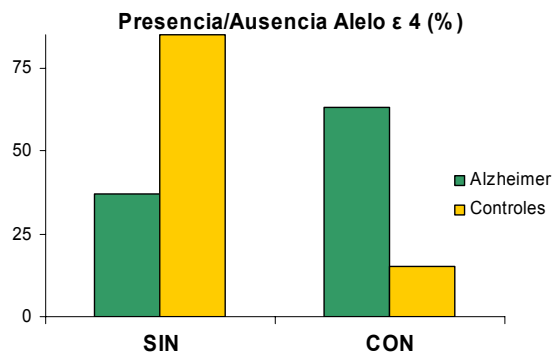


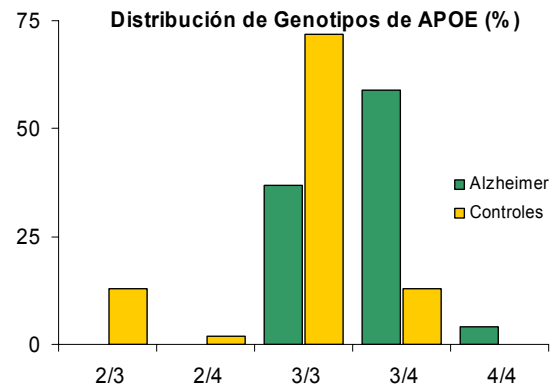
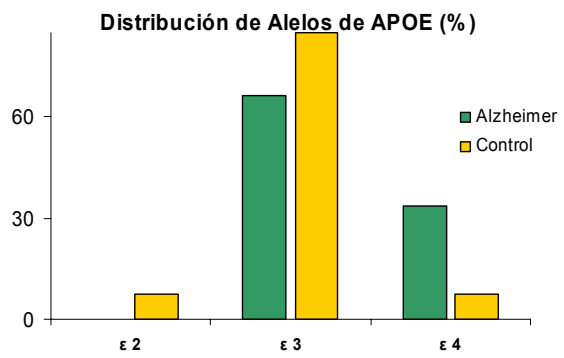
ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO ESPORÁDICO



Prueba de Wilcoxon Mann Whitney

VARIABLE	Estadístico	Valor P
Género	3784.5	1
Escolaridad	3150	0.039
Ocupación	3345.5	0.109
E. civil	3079	0.021
Lateralidad	3132	0.002
N° Hijos	2948	0.011
MMSE		
Tiempo	4707.5	0.0016
Lugar	4527	0.0069
Fijación	4155	0.0629
Atención/Cálculo	4290.5	0.0474
Evocación	4906.5	0.0003
Lenguaje	4356	0.0410
TOTAL MMSE	4904.5	0.0006





N. Equilibrio de H-W

Análisis en PLINK

GEN	SNP		Genotipos	Heterocigosidad		P-value
				Obs	Esp	
ADAM10	rs17269348	TODOS	0/15/118	0.1128	0.1064	1
	G/A	Pacientes	0/5/41	0.1087	0.1028	1
		Controles	0/10/77	0.1149	0.1083	1
	rs514049	TODOS	23/43/48	0.3772	0.476	0.03024
	C/A H-W dis	Pacientes	13/17/13	0.3953	0.5	0.2207
		Controles	10/26/35	0.3662	0.438	0.1783
	rs653765	TODOS	33/58/38	0.4496	0.4992	0.2899
	G/A	Pacientes	10/21/15	0.4565	0.4941	0.7645
		Controles	23/37/23	0.4458	0.5	0.3793
BACE1	rs535860	TODOS	2/27/104	0.203	0.2059	0.6884
	T/A	Pacientes	1/8/37	0.1739	0.1938	0.4211
		Controles	1/19/67	0.2184	0.2122	1
	rs638405	TODOS	14/73/43	0.5615	0.4751	0.04166
	C/G H-W dis	Pacientes	8/20/18	0.4348	0.4764	0.5464
		Controles	6/53/25	0.631	0.4744	0.00306
NCSTN	rs12239747	TODOS	0/13/113	0.1032	0.0978	1
	G/A	Pacientes	0/3/43	0.06522	0.0631	1
		Controles	0/10/70	0.125	0.1172	1
	rs7528638	TODOS	0/12/121	0.0902	0.0862	1
	G/C	Pacientes	0/6/40	0.1304	0.1219	1
		Controles	0/6/81	0.0689	0.0666	1
APOE	rs405509	TODOS	23/49/38	0.4495	0.4918	0.4351
	C/A	Pacientes	8/19/14	0.4634	0.4893	0.754
		Controles	15/30/23	0.4412	0.4931	0.4598
	rs429358	TODOS	2/40/91	0.3008	0.2761	0.5267
	C/T *	Pacientes	2/27/17	0.587	0.4468	0.0503
		Controles	0/13/74	0.1494	0.1383	1
	rs7412	TODOS	0/13/120	0.0977	0.0929	1
	T/C	Pacientes	0/0/46	0	0	1
		Controles	0/13/74	0.1494	0.1383	1

Análisis en SNPStats

GEN	SNP	TODOS	PACIENTES	CONTROLES
		P-value	P-value	P-value
ADAM10	rs17269348	1.00	1.00	1.00
	rs514049	0.03	0.22	0.18
	rs653765	0.29	0.76	0.38
BACE1	rs535860	0.69	0.42	1.00
	rs638405	0.045	0.55	0.0031
NCSTN	rs12239747	1.00	1.00	1.00
	rs7528638	1.00	1.00	1.00
APOE	rs405509	0.44	0.75	0.46
	rs429358	0.53	0.05	1.00
	rs7412	1.00	1.00	1.00

Análisis en GenePop

GEN	SNP	PACIENTES P-value	CONTROLES P-value	χ^2	Probabilidad
ADAM10	rs17269348	1.0000	1.0000	0.00	1.0000
	rs514049	0.2207	0.1783	6.4698	0.1667
	rs653765	0.7645	0.3793	2.4759	0.6490
BACE1	rs535860	0.4211	1.000	1.7297	0.7853
	rs638405	0.5464	0.0031	12.7859	0.0124
NCSTN	rs12239747	1.0000	1.0000	0.00	1.0000
	rs7528638	1.0000	1.0000	0.00	1.0000
APOE	rs405509	0.7540	0.4598	2.1186	0.7140
	rs429358	0.0504	1.00	5.9770	0.2009
	rs7412	---	1.00	NA	NA

O. Frecuencias alélicas

Análisis en PLINK

GEN	SNP	Alelos	Todos	Pacientes	Controles
ADAM10	rs17269348	A	0.943	0.946	0.943
	n=133 100%	G	0.056	0.054	0.057
	rs514049	A	0.609	0.5	0.676
	n=114 85.71%	C	0.390	0.5	0.323
	rs653765	A	0.519	0.554	0.5
	n=129 96.99%	G	0.480	0.445	0.5
BACE1	rs535860	A	0.883	0.891	0.879
	n=133 100%	T	0.116	0.108	0.120
	rs638405	G	0.611	0.609	0.613
	n=130 97.74%	C	0.388	0.391	0.386
NCSTN	rs12239747	A	0.948	0.967	0.938
	n=126 94.74%	G	0.051	0.032	0.062
	rs7528638	C	0.954	0.935	0.966
	n=133 100%	G	0.045	0.065	0.034
APOE	rs405509	A	0.564	0.573	0.559
	n=109 81.95%	C	0.435	0.426	0.441
	rs429358	T	0.834	0.663	0.925
	n=133 100%	C	0.165	0.337	0.074
	rs7412	C	0.951	1.0	0.925
	n=133 100%	T	0.048	0	0.074

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO ESPORÁDICO

Análisis en SNPStats

GEN	SNP	Alelos	Todos	Pacientes	Controles
ADAM10	rs17269348 n=133 100%	A	0.94	0.95	0.94
		G	0.06	0.05	0.06
	rs514049 n=114 85.71%	A	0.61	0.5	0.68
		C	0.39	0.5	0.32
rs653765 n=129 96.99%	A	0.52	0.55	0.5	
	G	0.48	0.45	0.5	
BACE1	rs535860 n=133 100%	A	0.88	0.89	0.88
		T	0.12	0.11	0.12
	rs638405 n=130 97.74%	G	0.61	0.61	0.61
		C	0.39	0.39	0.39
NCSTN	rs12239747 n=126 94.74%	A	0.95	0.97	0.94
		G	0.05	0.03	0.06
	rs7528638 n=133 100%	C	0.95	0.93	0.97
		G	0.05	0.07	0.03
APOE	rs405509 n=109 81.95%	A	0.56	0.57	0.56
		C	0.44	0.43	0.44
	rs429358 n=133 100%	T	0.83	0.66	0.93
		C	0.17	0.34	0.07
	rs7412 n=133 100%	C	0.95	1.0	0.93
		T	0.05	0	0.07

Análisis en GenePop

GEN	SNP	Alelos	Pacientes	Controles
ADAM10	rs17269348	A	0.946	0.943
		G	0.054	0.057
	rs514049	A	0.5	0.676
		C	0.5	0.324
	rs653765	G	0.446	0.5
		A	0.554	0.5
BACE1	rs638405	G	0.609	0.613
		C	0.391	0.387
	rs535860	A	0.891	0.879
		T	0.109	0.121
NCSTN	rs12239747	A	0.967	0.938
		G	0.033	0.062
	rs7528638	G	0.065	0.034
		C	0.935	0.966
APOE	rs405509	A	0.573	0.559
		C	0.427	0.441
	rs429358	T	0.663	0.925
		C	0.337	0.075
	rs7412	C	1.0	0.925
		T	0.0	0.075

P. Frecuencias genotípicas

Análisis en SNPStats

GEN	SNP	Genotipos	Todos	Pacientes	Controles
ADAM10	rs17269348	A/A	0.89	0.89	0.89
		A/G	0.11	0.11	0.11
		G/G	---	---	---
	rs514049	A/A	0.42	0.3	0.49
		A/C	0.38	0.4	0.37
		C/C	0.2	0.3	0.14
	rs653765	A/A	0.29	0.33	0.28
		A/G	0.45	0.46	0.45
		G/G	0.26	0.22	0.28
BACE1	rs535860	A/A	0.78	0.8	0.77
		A/T	0.2	0.17	0.22
		T/T	0.02	0.02	0.01
	rs638405	C/C	0.11	0.17	0.07
		C/G	0.56	0.43	0.63
		G/G	0.33	0.39	0.3
NCSTN	rs12239747	A/A	0.9	0.93	0.88
		A/G	0.1	0.07	0.12
		G/G	---	---	---
	rs7528638	C/C	0.91	0.87	0.93
		C/G	0.09	0.13	0.07
		G/G	---	---	---
APOE	rs405509	A/A	0.34	0.34	0.34
		A/C	0.45	0.46	0.44
		C/C	0.21	0.2	0.22
	rs429358	C/C	0.02	0.04	---
		T/C	0.3	0.59	0.15
		T/T	0.68	0.37	0.85
	rs7412	C/C	0.9	1.0	0.85
		C/T	0.1	0	0.15
		T/T	---	---	---

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO ESPORÁDICO

Análisis en GenePop – Diferenciación Génica y diferenciación Genotípica

GEN	SNP	Alelos	Pacientes	Controles	P-Value S.E.	Genotipos	Pacientes	Controles	P-value S.E.
ADAM10	rs17269348	A	87	164	1 0	A/A	41	77	1 0
		G	5	10		A/G	5	10	
						G/G	---	---	
	rs514049	A	43	96	0.013 ; 0.0014	A/A	13	35	0.0218 0.0017
		C	43	46		A/C	17	26	
						C/C	13	10	
rs653765	G	41	83	0.446 0.0070	A/A	15	23	0.455 0.0059	
	A	51	83		A/G	21	37		
					G/G	10	23		
BACE1	rs535860	A	82	153	0.842 0.0017	A/A	37	67	0.844 0.0021
		T	10	21		A/T	8	19	
						T/T	1	1	
	rs638405	G	56	103	1 0	C/C	8	6	1 0
C		36	65	C/G		20	53		
					G/G	18	25		
NCSTN	rs12239747	A	89	150	0.382 0.0032	A/A	43	70	0.368 0.0026
		G	3	10		A/G	3	10	
						G/G	---	---	
	rs7528638	G	6	6	0.354 0.0034	C/C	40	81	0.343 0.0030
C		86	168	C/G		6	6		
					G/G	---	---		
APOE	rs405509	A	47	76	0.888 0.0020	A/A	14	23	0.892 0.0013
		C	35	60		A/C	19	30	
						C/C	8	15	
	rs429358	T	61	161	0 0	C/C	2	0	0 0
		C	31	13		T/C	27	13	
						T/T	17	74	
rs7412	C	92	161	0.0032 0.0003	C/C	46	74	0.0030 0.00036	
	T	0	13		C/T	0	13		
					T/T	---	---		

Q. Pruebas de asociación

Análisis en SNPStats, Asociación genotípica

GEN	SNP	Modelo	Genotipo	Pacientes %	Controles %	Valor P	OR		
ADAM10	rs17269348	----	A/A	89.1	88.5	0.91	1.00		
			A/G	10.9	11.5		0.94 (0.30–2.93)		
			Codominante	A/A	30.2		49.3	1.00	
	rs514049	Codominante	A/C	39.5	36.6	0.055	1.76 (0.73- 4.26)		
			C/C	30.2	14.1		3.50 (1.24- 9.92)		
			Dominante	A/A	30.2		49.3	0.044	1.00
			A/C-C/C	69.8	50.7		2.24 (1.01- 4.99)		
			Recesivo	A/A-A/C	69.8		85.9	0.04	1.00
				C/C	30.2		14.1		2.64 (1.04- 6.72)
			Sobredominante	A/A-C/C	60.5		63.4	0.76	1.00
				A/C	39.5		36.6		1.13 (0.52- 2.47)
			Aditivo	----	----		----	0.016	1.86 (1.11- 3.11)
			rs653765	Codominante	A/A		32.6	27.7	0.72
	G/A	45.6			44.6	0.87 (0.37- 2.02)			
	G/G	21.7			27.7	0.67 (0.25- 1.79)			
	Dominante	A/A		32.6	27.7	0.56	1.00		
		G/A-G/G		67.4	72.3		0.79 (0.36- 1.73)		
	Recesivo	A/A-G/A		78.3	72.3	0.45	1.00		
		G/G		21.7	27.7		0.72 (0.31-1.69)		
	Sobredominante	A/A-G/G		54.4	55.4	0.91	1.00		
G/A		45.6		44.6	1.04 (0.51- 2.15)				
Aditivo	----	----		----	0.42	0.82 (0.50 -1.34)			
BACE1	rs535860	Codominante	A/A	80.4	77	0.76	1.00		
			T/A	17.4	21.8		0.87 (0.37- 2.02)		
			T/T	2.2	1.1		0.67 (0.25- 1.79)		
		Dominante	A/A	80.4	77	0.65	1.00		
			T/A-T/T	19.6	23		0.79 (0.36- 1.73)		
		Recesivo	A/A-T/A	97.8	98.8	0.65	1.00		
			T/T	2.2	1.1		0.72 (0.31-1.69)		
		Sobredominante	A/A-T/T	82.6	78.2	0.54	1.00		
			T/A	17.4	21.8		0.75 (0.30- 1.88)		
		Aditivo	----	----	----	0.77	0.89 (0.40 -1.97)		

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO ESPORÁDICO

GEN	SNP	Modelo	Genotipo	Pacientes %	Controles %	Valor P	OR
	rs638405	Codominante	G/G	39.1	29.8	0.06	1.00
			G/C	43.5	63.1		0.52 (0.24- 1.16)
			C/C	17.4	7.1		1.85 (0.55- 6.27)
		Dominante	G/G	39.1	29.8	0.28	1.00
			G/C-C/C	60.9	70.2		0.66 (0.31- 1.40)
		Recesivo	G/G-G/C	82.6	92.9	0.078	1.00
			C/C	17.4	7.1		2.74 (0.89- 8.45)
		Sobredominante	G/-C/C	56.5	36.9	0.031	1.00
			G/C	43.5	63.1		0.45 (0.22- 0.94)
		Aditivo	----	----	----	0.94	1.02 (0.57- 1.82)
NCSTN	rs12239747	----	A/A	93.5	87.5	0.27	1.00
			A/G	6.5	12.5		0.49 (0.13- 1.87)
	rs7528638	----	C/C	87	93.1	0.25	1.00
			G/C	13	6.9		2.02 (0.61- 6.68)
APOE	rs405509	Codominante	A/A	34.1	33.8	0.95	1.00
			A/C	46.3	44.1		1.04 (0.43- 2.50)
			C/C	19.5	22.1		0.88 (0.30- 2.59)
		Dominante	A/A	34.1	33.8	0.97	1.00
			A/C-C/C	65.8	66.2		0.99 (0.44- 2.23)
		Recesivo	A/A-A/C	80.5	77.9	0.75	1.00
			C/C	19.5	22.1		0.86 (0.33- 2.24)
		Sobredominante	A/A-C/C	53.7	55.9	0.82	1.00
			A/C	46.3	44.1		1.09 (0.50- 2.38)
		Aditivo	----	----	----	0.84	0.95 (0.56- 1.61)
	rs429358	Codominante	T/T	37	85.1	<0.0001	1.00
			C/T	58.7	14.9		9.04 (3.88- 21.07)
			C/C	4.3	0		NA (0.00- NA)
		Dominante	T/T	37	85.1	<0.0001	1.00
C/T-C/C			63	14.9	9.71 (4.19- 22.50)		
Recesivo		T/T-C/T	95.7	100	0.038	1.00	
		C/C	4.3	0		NA (0.00- NA)	
rs7412		Sobredominante	T/T-C/C	41.3	85.1	<0.0001	1.00
			C/T	58.7	14.9		8.09 (3.52- 18.58)
		Aditivo	----	----	----	<0.0001	9.31 (4.06- 21.35)
----	C/C	85.1	100	6×10^{-4}	1.00		
	C/T	14.9	0		0.00 (0.00- NA)		

Análisis en PLINK, prueba de asociación genotípica

GEN	SNP	Alelo 1	Alelo 2	Prueba	Pacientes	Controles	χ^2	Valor P
ADAM10	rs17269348	G	A	Genotípica	0/5/41	0/10/77	NA	NA
				Alélica	5/87	10/164	0.0117	0.9163
				Dominante	5/41	10/77	NA	NA
				Recesiva	0/46	0/87	NA	NA
	rs514049	C	A	Genotípica	13/17/13	10/26/35	5.833	0.054 *
				Alélica	43/43	46/96	6.976	0.0082
				Dominante	30/13	36/35	3.992	0.0457
				Recesiva	13/30	10/61	4.336	0.0373
	rs653765	G	A	Genotípica	10/21/15	23/37/23	0.661	0.718
				Alélica	41/51	83/83	0.700	0.402
				Dominante	31/15	60/23	0.341	0.558
				Recesiva	10/36	23/60	0.554	0.456
BACE1	rs535860	T	A	Genotípica	1/8/37	1/19/67	NA	NA
				Alélica	10/82	21/153	0.840	0.771
				Dominante	9/37	20/67	NA	NA
				Recesiva	1/45	1/86	NA	NA
	rs638405	C	G	Genotípica	8/20/18	6/53/25	5.724	0.057 *
				Alélica	36/56	65/103	0.004	0.944
				Dominante	28/18	59/25	1.179	0.277
				Recesiva	8/38	6/78	3.249	0.071
NCSTN	rs12239747	G	A	Genotípica	0/3/43	0/10/70	NA	NA
				Alélica	3/89	10/150	1.067	0.301
				Dominante	3/43	10/70	NA	NA
				Recesiva	0/46	0/80	NA	NA
	rs7528638	G	C	Genotípica	0/6/40	0/6/81	NA	NA
				Alélica	6/86	6/168	1.32	0.250
				Dominante	6/40	6/81	NA	NA
				Recesiva	0/46	0/87	NA	NA
APOE	rs405509	C	A	Genotípica	8/19/14	15/30/23	0.107	0.947
				Alélica	35/47	60/76	0.042	0.836
				Dominante	27/14	45/23	0.001	0.9725
				Recesiva	8/33	15/53	0.099	0.752
	rs429358	C	T	Genotípica	2/27/17	0/13/74	NA	NA
				Alélica	31/61	13/161	29.98	4.37*10⁻⁵
				Dominante	29/17	13/74	NA	NA
				Recesiva	2/44	0/87	NA	NA
	r7412	T	C	Genotípica	0/0/46	0/13/74	NA	NA
				Alélica	0/92	13/161	7.227	0.0071
				Dominante	0/46	13/74	NA	NA
				Recesiva	0/46	0/87	NA	NA

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO ESPORÁDICO

Análisis en PLINK, prueba de asociación alélica

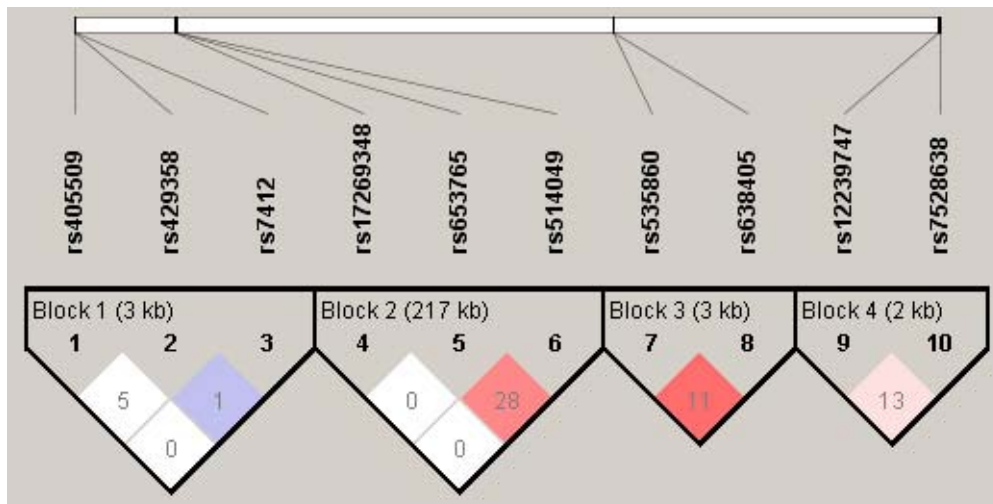
GEN	SNP	Posición (bp)	A1	Pacientes	Controles	A 2	χ^2	Valor P	OR
ADAM10	rs17269348	58824641	G	0.054	0.057	A	0.011	0.9163	0.94(0.31-2.84)
	rs514049	59042363	C	0.5	0.3239	A	6.976	0.0083	2.09(1.20-3.62)
	rs653765	59042012	G	0.446	0.5	A	0.70	0.403	0.80(0.48-1.34)
BACE1	rs535860	117159878	T	0.109	0.121	A	0.084	0.772	0.89(0.39-1.98)
	rs638405	117163824	C	0.391	0.387	G	0.005	0.945	1.02(0.60-1.72)
NCSTN	rs12239747	160321065	G	0.033	0.063	A	1.067	0.302	0.51(0.14-1.89)
	rs7528638	160323903	G	0.065	0.034	C	1.32	0.251	1.95(0.61-6.24)
APOE	rs405509	45408836	C	0.426	0.441	A	0.043	0.836	0.94(0.54-1.64)
	r429358	45411741	C	0.337	0.0747	T	29.98	4.4e-5	6.29(3.09-12.82)
	r7412	45412079	T	0	0.074	C	7.227	0.0071	---

R. Determinación de haplotipos

Análisis en SNPStats, Determinación de haplotipos para cada gen

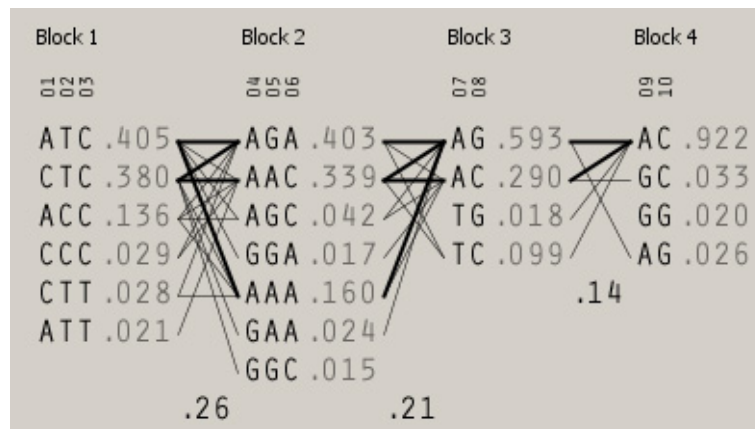
GEN	SNP			Frecuencias		
				TOTAL	Pacientes	Controles
ADAM10	rs17269348	rs653765	rs514049			
	A	G	A	0.4027	0.3664	0.4286
	A	A	C	0.3391	0.4199	0.2853
	A	A	A	0.1599	0.1081	0.1933
	A	G	C	0.0419	0.0512	0.0354
	G	A	A	0.0238	0.0264	0.0213
	G	G	A	0.0171	0	0.022
	G	G	C	0.0154	0.028	0.0082
	G	A	C	0	NA	0.006
BACE1	rs535860	rs638405				
	A	G		0.5934	0.5841	0.6019
	A	C		0.2901	0.3073	0.2774
	T	C		0.099	0.0841	0.1104
	T	G		0.0175	0.0246	0.0102
NCSTN	rs12239747	rs7528638				
	A	C		0.9223	0.9116	0.9279
	G	C		0.0326	0.0232	0.376
	A	G		0.0255	0.0558	0.0072
	G	G		0.0196	0.0095	0.0273
APOE	rs405509	r429358	r7412			
	A	T	C	0.4053	0.2827	0.4664
	C	T	C	0.3805	0.3803	0.3914
	A	C	C	0.1362	0.2835	0.0673
	C	C	C	0.0292	0.0534	2 X10 ⁻⁴
	C	T	T	0.0281	NA	0.0435
	A	T	T	0.0207	NA	0.024
A	C	T	0	NA	0.0072	

Análisis en HAPLOVIEW. Determinación de haplotipos para cada gen



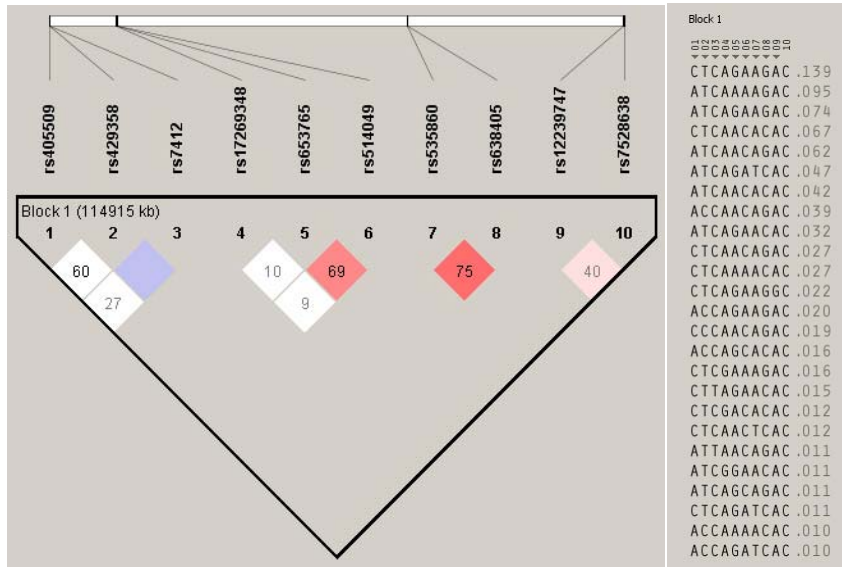
Análisis en HAPLOVIEW. Frecuencias totales de los haplotipos, para pacientes y controles, valor de chi-cuadrado y valor p de significancia.

Frecuencias					
	Haplotipo	Pacientes	Controles	χ^2	Valor p
ADAM10					
	AGA	0.403	0.360	0.425	1.044
	AAC	0.339	0.415	0.299	3.646
	AAA	0.160	0.118	0.182	1.853
	AGC	0.042	0.052	0.037	0.36
	GAA	0.024	0.021	0.025	0.042
	GGA	0.017	0.008	0.022	0.653
	GGC	0.015	0.025	0.010	0.821
BACE1					
	AG	0.593	0.585	0.598	0.039
	AC	0.290	0.306	0.282	0.175
	TC	0.099	0.085	0.106	0.299
	TG	0.018	0.023	0.014	0.288
NCSTN					
	AC	0.922	0.913	0.927	0.187
	GC	0.033	0.022	0.038	0.478
	AG	0.026	0.055	0.010	4.863
	GG	0.020	0.010	0.024	0.621
APOE					
	ATC	0.405	0.299	0.461	6.541
	CTC	0.380	0.364	0.389	0.168
	ACC	0.136	0.274	0.063	22.775
	CCC	0.029	0.063	0.011	5.572
	CTT	0.028	0.000	0.043	4.072
	ATT	0.021	0.000	0.032	2.977



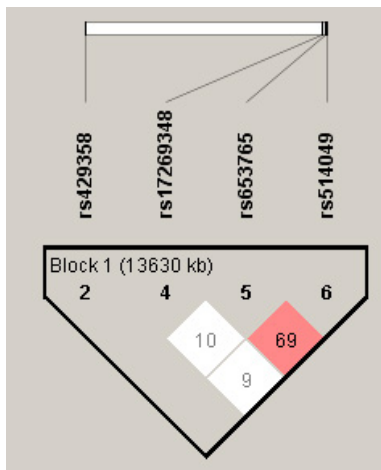
Haplotipos conformados para cada gen y sus frecuencias. Las líneas delgadas representan una frecuencia mayor del 1% y las líneas gruesas representan frecuencias mayores al 10%. Bloque 1 formado por rs405509, rs429358 y rs7412 (APOE). Para el bloque 2 rs17269348, rs653765 y rs514049 (ADAM10). Bloque 3 rs535860 y rs638405 (BACE1) y bloque 4 formado por rs12239747 y rs7528639 (NCSTN)

Análisis en HAPLOVIEW. Determinación de un bloque haplotípico para todos los marcadores.

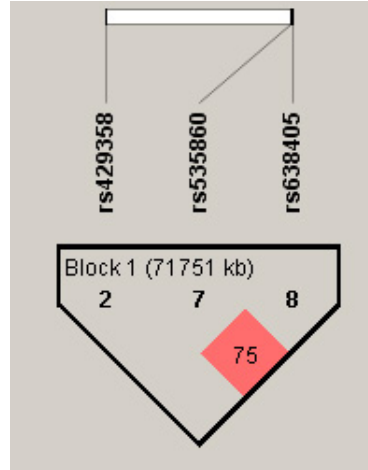


BLOQUES	Frecuencias				Valor p
	Haplotipo	Pacientes	Controles	χ^2	
CTCAGAAGAC	0.139	0.113	0.153	0.804	0.3699
ATCAAAAGAC	0.095	0.070	0.109	1.095	0.2953
ATCAGAAGAC	0.074	0.051	0.087	1.12	0.2898
CTCAACACAC	0.067	0.075	0.063	0.153	0.6953
ATCAACAGAC	0.062	0.047	0.071	0.595	0.4403
ATCAGATCAC	0.047	0.033	0.055	0.658	0.4173
ATCAACACAC	0.042	0.023	0.052	1.255	0.2626
ACCAACAGAC	0.039	0.082	0.016	6.984	0.0082
ATCAGAACAC	0.032	0.028	0.034	0.06	0.8065
CTCAACAGAC	0.027	0.032	0.025	0.094	0.7593
CTCAAAACAC	0.027	0.014	0.034	0.934	0.3338
CTCAGAAGGC	0.022	0.022	0.022	0.0010	0.9702
ACCAGAAGAC	0.020	0.043	0.007	4.083	0.0433
CCCAACAGAC	0.019	0.037	0.009	2.741	0.0978
ACCAGCACAC	0.016	0.027	0.011	1.013	0.3143
CTCGAAAGAC	0.016	0.011	0.019	0.232	0.63
CTTAGAACAC	0.015	0.000	0.023	2.105	0.1469
CTCGACACAC	0.012	0.009	0.013	0.08	0.7766
CTCAACTCAC	0.012	0.009	0.013	0.109	0.7408
ATTAACAGAC	0.011	0.000	0.017	1.607	0.205
ATCGGAACAC	0.011	0.011	0.012	0.0020	0.9624
ATCAGCAGAC	0.011	0.012	0.011	0.0060	0.9402
CTCAGATCAC	0.011	0.019	0.006	0.937	0.333
ACCAAAACAC	0.010	0.016	0.007	0.461	0.4972
ACCAGATCAC	0.010	0.011	0.010	0.0050	0.9422

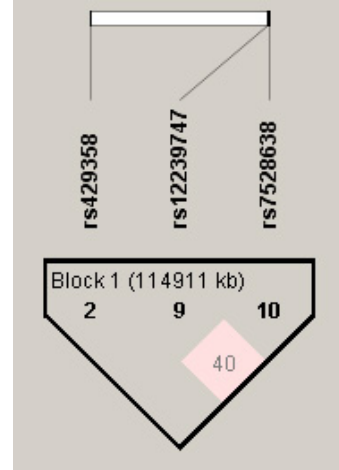
Análisis en HAPLOVIEW. Determinación de bloques de haplotipos para el marcador rs429358 de APOE y los marcadores de cada gen.



a. ADAM10



b. BACE1



c. NCSTN

Frecuencias					
Haplotipo	Pacientes	Controles	χ^2	Valor p	
ADAM10					
TAGA	0.347	0.2550	0.396	5.287	0.0215
TAAC	0.255	0.228	0.269	0.53	0.466
TAAA	0.149	0.093	0.179	3.537	0.06
CAAC	0.085	0.193	0.028	21.07	4.4 x10 -2
CAGA	0.056	0.107	0.029	6.926	0.0085
TAGC	0.028	0.036	0.024	0.342	0.5587
TGAA	0.023	0.019	0.025	0.086	0.7697
TGGA	0.016	0.007	0.021	0.784	0.3761
TGGC	0.016	0.025	0.011	0.716	0.3975
CAGC	0.013	0.016	0.012	0.067	0.7965
BACE1					
TAG	0.497	0.384	0.556	7.14	0.0075
TAC	0.237	0.202	0.255	0.924	0.3365
CAG	0.099	0.202	0.044	16.85	4.05 x 10 -1
TTC	0.093	0.072	0.104	0.732	0.3924
CAC	0.051	0.103	0.024	7.733	0.0054
NCSTN					
TAC	0.765	0.599	0.853	21.588	3.38 x 10 -2
CAC	0.157	0.313	0.075	25.826	3.74 x 10 -3
TGC	0.033	0.023	0.038	0.445	0.5047
TGG	0.020	0.010	0.025	0.718	0.3969
TAG	0.017	0.031	0.009	1.793	0.1805

Bibliografía

- 1000 Genomes Project Consortium. (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467, 1061-73.
- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G.R., Auton, A., Brooks, L.D., DePristo, M.A., Durbin, R.M. et al. (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, 491, 56-65.
- Acosta-Baena, N., Sepulveda-Falla, D., Lopera-Gómez, C.M., Jaramillo-Elorza, M.C., Moreno, S. et al. (2011) Pre-dementia clinical stages in presenilin 1 E280A familial early-onset Alzheimer's disease: a retrospective cohort study. *Lancet Neurol.*, 10, 213-20.
- Albert, M.S., DeKosky, S.T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H.H., Fox, N.C. et al. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzh & Dement.*, 7, 270-9.
- Alzheimer's Disease International (ADI). (2009) World Alzheimer Report 2009. Prince, M. & Jackson, J., eds., London, UK. 96pp.
- American Psychiatric Association. (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed., text rev.). Washington, DC: Author.
- Arango, D., Cruts, M., Torres, O., Backhovens, H., Serrano, M. L., Villareal, E. et al. (2001). Systematic genetic study of Alzheimer disease in Latin America: mutation frequencies of the amyloid beta precursor protein and presenilin genes in Colombia. *Am. J. Med. Genet.*, 103, 138-143.
- Arboleda, G. H., Yunis, J. J., Pardo, R., Gomez, C. M., Hedmont, D., Arango, G. et al. (2001). Apolipoprotein E genotyping in a sample of Colombian patients with Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.*, 305, 135-138.
- Arcos-Burgos, M. & Muenke, M. (2002). Genetics of population isolates. *Clin.Genet.*, 61, 233-247.
- Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 118, 167-179.
- Ardlie, K.G., Kruglyak, L. & Seielstad, M. (2002). Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 299-309.
- Avramopoulos, D. (2009). Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Med.*, 1, 34.
- Barrett, J.C, Fry, B., Maller, J. & Daly, M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 21, 263-5.
- Bedoya, G., Montoya, P., Garcia, J., Soto, I., Bourgeois, S., Carvajal, L. et al. (2006). Admixture dynamics in Hispanics: a shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 103, 7234-7239.
- Beeri, M.S., Rapp, M., Schmeidler, J., Reichenberg, A., Purohit, D.P., Perl, D.P. et al. (2009) Number of children is associated with neuropathology of Alzheimer's disease in women. *Neurobiol Aging.*, 30, 1184-91.
- Bekris LM, Galloway NM, Millard S, Lockhart D, Li G, Galasko DR et al. (2011) Amyloid precursor protein (APP) processing genes and cerebrospinal fluid APP cleavage product levels in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 32, 556.e13-23.
- Bekris, L.M., Lutz, F., Li, G., Galasko, D.R., Farlow, M.R., Quinn, J.F. et al. (2012) ADAM10 expression and promoter haplotype in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*, 33, 2229.e1-2229.e9.
- Bertram L, McQueen M, Mullin K, Blacker D, Tanzi R. The AlzGene Database. Alzheimer Research Forum. Available at: <http://www.alzgene.org>. Accessed [24/09/2011; 18/01/2012; 25/06/2012; 01/03/2013].
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D. & Tanzi, R.E. (2007) Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39, 17-23.
- Bertram, L. & Tanzi, R. E. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat.Rev.Neurosci.*, 9, 768-778.
- Bertram, L., Lill, C. M. & Tanzi, R. E. (2010), The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*, 68, 270-81.
- Bertram, L. & Tanzi, R.E. (2012). The genetics of Alzheimer's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.*;107, 79-100.
- Bettens, K., Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2010). Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum.Mol Genet.*, 19(R1), R4-R11.
- Bettens, K., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 12, 92-104.

- Borroni, B., Pilotto, A., Bonvicini, C., Archetti, S., Alberici, A., Lupi, A. et al. (2012) Atypical presentation of a novel Presenilin 1 R377W mutation: sporadic, late-onset Alzheimer disease with epilepsy and frontotemporal atrophy. *Neurol Sci.* 33, 375-8.
- Botero, L.E., Toro, A.E., Patiño, A.J., Salazar, G., Rodríguez, J.C., Suárez-Escudero, J.C. et al. (2012), Diabetes mellitus in patients with Alzheimer's disease: clinical description and correlation with the APOE genotype in a sample population from the province of Antioquia, Colombia. *Biomedica.* 32, 239-51.
- Braak, H. & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-259.
- Brookfield, J.F. (2010) Q&A: promise and pitfalls of genome-wide association studies. *BMC Biol.* 8, 41.
- Brouwers, N., Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2008). Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Ann.Med.*, 40, 562-583.
- Bu, G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat.Rev.Neurosci.*, 10, 333-344.
- Butler, A.W., Ng, M.Y., Hamshere, M.L., Forabosco, P., Wroe, R., Al-Chalabi, A., Lewis, C.M., Powell, J.F. (2009) Meta-analysis of linkage studies for Alzheimer's disease--a web resource. *Neurobiol Aging*, 30, 1037-47.
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M., & Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol.Aging*, 23, 655-664.
- Cai, G., Atzmon, G., Naj, A.C., Beecham, G.W., Barzilai, N., Haines, J.L. et al. (2012). Evidence against a role for rare ADAM10 mutations in sporadic Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 33, 416-417.
- Calero, O., Bullido, M.J., Clarimón, J., Frank-García, A., Martínez-Martín, P., Lleó, A. et al. (2012). A common BACE1 polymorphism is a risk factor for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS One.* 7, e43926.
- Camelo, D., Arboleda, G., Yunis, J. J., Pardo, R., Arango, G., Solano, E. 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, 47-51.
- Cardon, L.R. & Bell, J.I. (2001). Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2, 91-9.
- Carvajal-Carmona, L. G., Soto, I. D., Pineda, N., Ortíz-Barrientos, D., Duque, C., Ospina-Duque, J. et al. (2000). Strong Amerind/white sex bias and a possible Sephardic contribution among the founders of a population in northwest Colombia. *Am J Hum Genet.*, 67, 1287-1295.
- Cherbuin, N., Sachdev, P.S. & Anstey, K.J. (2011) Mixed handedness is associated with greater age-related decline in volumes of the hippocampus and amygdala: the PATH through life study. *Brain Behav.* 2, 125-34.
- Clarimón, J., Bertranpetit, J., Calafell, F., Boada, M., Tàrraga, L. & Comas, D. (2003). Association study between Alzheimer's disease and genes involved in Abeta biosynthesis, aggregation and degradation: suggestive results with BACE1. *J Neurol.* 250, 956-61.
- Cole, S. L. & Vassar, R. (2008). The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J Biol Chem*, 283, 29621-29625.
- Confaloni, A., Terreni, L., Piscopo, P., Crestini, A., Campeggi, L.M., Frigerio, C.S. et al. (2003). Nicastrin gene in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 353, 61-5.
- Corbo, R.M. & Scacchi, R. (1999). Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet.* 63, 301-10.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W. et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261, 921-923.
- Cousin, E., Hannequin, D., Macé, S., Dubois, B., Ricard, S., Génin, E. et al. (2003). No replication of the association between the Nicastrin gene and familial early-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 353, 153-5.
- Cruts, M., Theuns, J., Van Broeckhoven, C. (2012). Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat.* 33, 1340-4.
- Chou, C.Y., Lin, Y.L., Huang, Y.C., Sheu, S.Y., Lin, T.H., Tsay, H.J. et al. (2005) Structural variation in human apolipoprotein E3 and E4: secondary structure, tertiary structure, and size distribution. *Biophys J.* 88, 455-66.
- de Strooper, B., Vassar, R., & Golde, T. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat.Rev Neurol.* 6, 99-107.
- de Bakker, P.I., Yelensky, R., Pe'er, I., Gabriel, S.B., Daly, M.J., Altshuler, D. (2005) Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet.* 37, 1217-23.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M. B. et al. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.* 118, 4002-4013.
- Deary, I.J., Hamilton, G., Hayward, C., Whalley, L.J., Powell, J., Starr, J.M. et al. (2005) Nicastrin gene polymorphisms, cognitive ability level and cognitive ageing. *Neurosci Lett.* 373, 110-4.

-
- Dermaut, B., Theuns, J., Sleegers, K., Hasegawa, H., Van den Broeck, M., Vennekens, K. et al. (2002). The gene encoding nicastrin, a major gamma-secretase component, modifies risk for familial early-onset Alzheimer disease in a Dutch population-based sample. *Am J Hum Genet.*, 70, 1568-1574.
- Deshpande, A., Kawai, H., Metherate, R., Glabe, C. G., & Busciglio, J. (2009). A role for synaptic zinc in activity-dependent Abeta oligomer formation and accumulation at excitatory synapses. *J Neurosci.*, 29, 4004-4015.
- Donmez, G., Wang, D., Cohen, D. E. & Guarente, L. (2010). SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10. *Cell*, 142, 320-332.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.*, 160, 113-123.
- Eichler, E. E., Nickerson, D. A., Altshuler, D., Bowcock, A. M., Brooks, L. D., Carter, N. P. et al. (2007). Completing the map of human genetic variation. *Nature*, 447, 161-165.
- Endres, K & Fahrenholz, F. (2010). Upregulation of the alpha-secretase ADAM10--risk or reason for hope? *FEBS J.* 277, 1585-1596.
- Ewers, M., Insel, P.S., Stern, Y., Weiner, M.W. & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). (2013) Cognitive reserve associated with FDG-PET in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 80, 1194-201.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M. et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366, 2112-2117.
- Fontana, L. (2009). Modulating human aging and age-associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790, 1133-1138.
- Forero, D. A., Benitez, B., Arboleda, G., Yunis, J. J., Pardo, R., & Arboleda, H. (2006a). Analysis of functional polymorphisms in three synaptic plasticity-related genes (BDNF, COMT AND UCHL1) in Alzheimer's disease in Colombia. *Neurosci. Res.*, 55, 334-341.
- Forero, D. A., Arboleda, G., Yunis, J. J., Pardo, R., & Arboleda, H. (2006b). 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, 1253-1262.
- Forero, D.A., Pinzón, J., Arboleda, G.H., Yunis, J.J., Alvarez, C., Cataño, N. & Arboleda, H. (2006c). Analysis of common polymorphisms in angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein e genes and human longevity in Colombia. *Arch Med Res.*, 37, 890-4.
- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B. et al. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 296, 2225-9.
- Guerreiro, R.J., Gustafson, D.R., Hardy, J. 2012 The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging*. 33, 437-56.
- Haass, C. (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.*, 23, 483-488.
- Haass, C. & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev Mol Cell Biol*, 8, 101-112.
- Halder, I. & Shriver, M. D. (2003). Measuring and using admixture to study the genetics of complex diseases. *Hum. Genomics*, 1, 52-62.
- Hanlon, C.S. & Rubinsztein, D.C. (1995). Arginine residues at codons 112 and 158 in the apolipoprotein E gene correspond to the ancestral state in humans. *Atherosclerosis*. 112, 85-90.
- Hardy, J. A. & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256, 184-185.
- Hardy, J. A. & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297, 353-356.
- Hardy, J. (2006). A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron*, 52, 3-13.
- Hardy, J. & Singleton, A. (2008). The HapMap: charting a course for genetic discovery in neurological diseases. *Arch. Neurol.*, 65, 319-321.
- Hardy, J. (2009). The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. *J Neurochem.*, 110, 1129-1134.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41, 1088-93.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. (2007) Principles of population genetics. 4th Edition. Sinauer Assoc, Inc. Sunderland, Mass. USA, 565pp. p50.
- Hatters, D. M., Peters-Libeu, C. A., & Weisgraber, K. H. (2006). Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.*, 31, 445-454.
- Håkansson, K., Rovio, S., Helkala, E.L., Vilska, A.R., Winblad, B., Soininen, H. et al. (2009). Association between mid-life marital status and cognitive function in later life: population based cohort study. *BMJ*, 339,b2462.

- Helisalmi, S., Dermaut, B., Hiltunen, M., Mannermaa, A., Van den Broeck, M., Lehtovirta, M. et al. (2004). Possible association of nicastrin polymorphisms and Alzheimer disease in the Finnish population. *Neurology*, 63, 173-5.
- Hirschhorn, J.N., Lohmueller, K., Byrne, E., Hirschhorn, K. (2002). A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med.* 4, 45-61.
- Hoggart, C. J., Parra, E. J., Shriver, M. D., Bonilla, C., Kittles, R. A., Clayton, D. G. et al. (2003). Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum. Genet.*, 72, 1492-1504.
- Hunt, C. E. & Turner, A. J. (2009). Cell biology, regulation and inhibition of beta-secretase (BACE-1). *FEBS J*, 276, 1845-1859.
- Hyman, B.T., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Carrillo, M.C. et al. (2012). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers & Dement.* 8, 1-13.
- International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC). (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431, 931-945.
- International HapMap Consortium. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437, 1299-320.
- Ioannidis, J.P., Trikalinos, T.A., Ntzani, E.E., Contopoulos-Ioannidis, D.G. (2003). Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet* 361, 567-71.
- Jellinger, K. A. (2000). Clinical validity of Braak staging in the oldest-old. *Acta Neuropathol*, 99, 583-584.
- Jiang, Q., Lee, C. Y., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N. et al. (2008). ApoE promotes the proteolytic degradation of Aβ. *Neuron*, 58, 681-693.
- Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S. et al. 2012. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 488, 96-9.
- Kaether, C., Capell, A., Edbauer, D., Winkler, E., Novak, B., Steiner, H. et al. (2004). The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity. *EMBO J*, 23, 4738-4748.
- Kalaria, R. N., Maestre, G. E., Arizaga, R., Friedland, R. P., Galasko, D., Hall, K. et al. (2008). Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol.*, 7, 812-826.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., et al. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.
- Kern, A. & Behl, C. (2009). The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790, 1124-1132.
- Kidd, J. M., Cooper, G. M., Donahue, W. F., Hayden, H. S., Sampas, N., Graves, T. et al. (2008). Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature*, 453, 56-64.
- Kim, J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63, 287-303.
- Kim, M., Suh, J., Romano, D., Truong, M.H., Mullin, K., Hooli, B. et al. (2009). Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate {alpha}-secretase activity. *Hum Mol Genet.* 15, 3987-96.
- Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., & Selkoe, D. J. (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 6382-6387.
- Kitsios, G.D., Zintzaras, E. (2009) Genome-wide association studies: hypothesis-"free" or "engaged"? *Transl Res.*
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M. et al. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 3922-3927.
- Lammich, S., Buell, D., Zilow, S., Ludwig, A.K., Nuscher, B., Lichtenthaler, S.F. et al. (2010) Expression of the anti-amyloidogenic secretase ADAM10 is suppressed by its 5'-untranslated region. *J Biol Chem.* 285, 15753-60.
- Lammich, S., Kamp, F., Wagner, J., Nuscher, B., Zilow, S., Ludwig, A.K. et al. (2011). Translational repression of the disintegrin and metalloprotease ADAM10 by a stable G-quadruplex secondary structure in its 5'-untranslated region. *J Biol Chem.*, 286, 45063-72.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- Laws, S.M., Eckart, K., Friedrich, P., Eisele, T., Kurz, A., Förstl, H. & Riemenschneider M. (2010). No association of lipase C polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 31, 2192-3.
- Laws, S.M., Eckart, K., Friedrich, P., Kurz, A., Förstl, H. & Riemenschneider, M. (2011) Lack of evidence to support the association of polymorphisms within the alpha- and beta-secretase genes (ADAM10/BACE1) with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 32, 541-3.

-
- Li, H., Wetten, S., Li, L., St Jean, P.L., Upmanyu, R., Surh, L. et al. (2008). Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 6, 45-53.
- Llibre Rodríguez, J. J., Ferri, C. P., Acosta, D., Guerra, M., Huang, Y., Jacob, K. S. et al. (2008). Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *Lancet*, 372, 464-474.
- Lopera, F., Ardilla, A., Martínez, A., Madrigal, L., Arango-Viana, J. C., Lemere, C. A. et al. (1997). Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation. *JAMA*.277, 793-9.
- Lupton, M.K., Proitsi, P., Danillidou, M., Tsolaki, M., Hamilton, G., Wroe, R., Pritchard, M., Lord, K., Martin, B.M., Kloszewska, I., Soininen, H., Mecocci, P., Vellas, B., Harold, D., Hollingworth, P., Lovestone, S., Powell, J.F. (2011) Deep sequencing of the Nicastrin gene in pooled DNA, the identification of genetic variants that affect risk of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 6, e17298.
- Ma, L., Xiao, Y., Huang, H., Wang, Q., Rao, W., Feng, Y. et al. (2010). Direct determination of molecular haplotypes by chromosome microdissection. *Nat Methods*. 7, 299-301.
- Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C., Jr., & Weisgraber, K. H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.*, 25, 1277-1294.
- Mahley, R. W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240, 622-630.
- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., & Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103, 5644-5651.
- Manolio, T. A., Brooks, L. D. & Collins, F. S. (2008). A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J. Clin. Invest.*, 118, 1590-605.
- Manolio, T. A. & Collins, F. S. (2009). The HapMap and genome-wide association studies in diagnosis and therapy. *Annu.Rev. Med.*, 60, 443-56.
- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorf, L. A., Hunter, D. J. et al. (2009b). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461, 747-53.
- Manolio TA. (2010). Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N. Engl. J. Med.*, 363, 166-76.
- Marks, N. & Berg, M. J. (2008). Neurosecretases provide strategies to treat sporadic and familial Alzheimer disorders. *Neurochem.Int.*, 52, 184-215.
- Masters, C. L., Cappai, R., Barnham, K. J., & Villemagne, V. L. (2006a). Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics. *J Neurochem.*, 97, 1700-1725.
- Masters, C. L. & Beyreuther, K. (2006b). Alzheimer's centennial legacy: prospects for rational therapeutic intervention targeting the Abeta amyloid pathway. *Brain*, 129, 2823-2839.
- Mattsson, N. & Zetterberg, H. (2009). Future screening for incipient Alzheimer's disease--the influence of prevalence on test performance. *Eur.Neurol.*, 62, 200-203.
- McCarthy, M.I., Abecasis, G.R., Cardon, L.R., Goldstein, D.B., Little, J., Ioannidis, J.P. & Hirschhorn, J.N. (2008). Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.*, 9, 356-69.
- Mayeux, R., Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2, a006239.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D. & Stadlan, E.M. (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, 939-44.
- McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R.Jr, Kawas, C.H. et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dement*.7, 263-9.
- McKhann, G.M. (2011a). Changing concepts of Alzheimer disease. *JAMA*, 305, 2458-9.
- Mesa, NR, Mondragón, MC, Soto, ID, Parra, MV, Duque, C, Ortíz-Barrientos, D. et al. (2000). Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in Amerinds: pre- and post-Columbian patterns of gene flow in South America. *Am J Hum Genet.*, 67, 1277-86.
- Miners, J. S., van Helmond, Z., Kehoe, P. G., & Love, S. (2010). Changes with Age in the Activities of beta-secretase and the Abeta-degrading Enzymes Nephilysin, Insulin-degrading Enzyme and Angiotensin-converting Enzyme. *Brain Pathol*.20, 794-802.
- Morbelli, S., Perneczky, R., Drzezga, A., Frisoni, G.B., Caroli, A, van Berckel, B.N. et al. (2013). Metabolic networks underlying cognitive reserve in prodromal Alzheimer disease: a European Alzheimer disease consortium project. *J Nucl Med*. 54, 894-902.
- Moss, M. L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P. M. et al. (2007) The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem.*, 282, 35712-35721.

- Murphy, T., Yip, A., Brayne, C., Easton, D., Evans, J.G., Xuereb, J. et al. (2001) The BACE gene: genomic structure and candidate gene study in late-onset Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 12, 631-4.
- Nelson, P. T., Braak, H., & Markesbery, W. R. (2009). Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol. Exp. Neurol.*, 68, 1-14.
- Nowotny, P., Kwon, J.M., Chakraverty, S., Nowotny, V., Morris, J.C. & Goate, A.M. (2001). Association studies using novel polymorphisms in BACE1 and BACE2. *Neuroreport*. 12, 1799-802.
- O'Brien, R.J., Wong, P.C. 2011. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.*, 34, 185-204.
- Organización Panamericana de la Salud. (2003). Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados con la salud. 10ª revisión. 3Vol. Washington, DC.
- Orlacchio, A., Kawarai, T., Polidoro, M., Stefani, A., Orlacchio, A., St George-Hyslop, P.H., et al. (2002). Association analysis between Alzheimer's disease and the Nicastrin gene polymorphisms. *Neurosci Lett.*, 333, 115-8.
- Ortega, J.C. (2012) Estudio de diez polimorfismos –SNPs- en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) en una muestra colombiana. Aproximación a genotipos haploides. Trabajo de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 117pp.
- Parra-Bonilla, G., Arboleda, G., Yunis, J., Solano, E., Pardo, R., Arango, G. et al. (2003). Haplogroup analysis of the risk associated with APOE promoter polymorphisms (-219T/G, -491A/T and -427T/C) in Colombian Alzheimer's disease patients. *Neurosci.Lett.*, 349, 159-162.
- Pastor, P., Roe, C. M., Villegas, A., Bedoya, G., Chakraverty, S., García, G. et al. (2003.) Apolipoprotein E epsilon4 modifies Alzheimer's disease onset in an E280A PS1 kindred. *Ann Neurol.*, 54, 163-9.
- Pera, M., Alcolea, D., Sánchez-Valle, R., Guardia-Laguarta, C., Colom-Cadena, M., Badiola, N. et al. (2013) Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.*, 125, 201-13.
- Piscopo, P., Manfredi, A., Malvezzi-Campeggi, L., Crestini, A., Spadoni, O., Cherchi, R. et al. (2006) Genetic study of Sardinian patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 398, 124-8.
- Placanica, L., Zhu, L. & Li, Y.M. (2009). Gender- and age-dependent gamma-secretase activity in mouse brain and its implication in sporadic Alzheimer disease. *PLoS One.*; 4, e5088.
- Plamont, M.A., Chasseigneaux, S., Delasnerie-Lauprêtre, N., Beaudry, P., Peoc'h, K., Laplanche, J.L. (2003). Variation at the ADAM10 gene locus is not associated with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett.* 26, 132-4.
- Price, A.L., Butler, J., Patterson, N., Capelli, C., Pascali, V.L., Scarnicci, F., Ruiz-Linares, A. et al. (2008). Discerning the ancestry of European Americans in genetic association studies. *PLoS Genet.* 4, e236.
- Prince, M., Ferri, C. P., Acosta, D., Albanese, E., Arizaga, R., Dewey, M. et al. (2007). The protocols for the 10/66 dementia research group population-based research programme. *BMC Public Health.*, 20,165.
- Prinzen, C., Müller, U., Endres, K., Fahrenholz, F. & Postina, R. (2005). Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J.* 19, 1522-4.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D. et al. (2007). PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am. J. of Human Genet.*, 81, 559-75.
- Querfurth, H. W. & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *N.Engl.J Med*, 362,329-344.
- Ravid, R. (2009). Biobanks for biomarkers in neurological disorders: the Da Vinci bridge for optimal clinico-pathological connection. *J Neurol.Sci.*, 283, 119-126.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86, 248-249
- Reiss, K. & Saftig, P. (2009) The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol.*, 20, 126-137.
- Reitz, C., Brayne, C. & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 7, 137-52.
- Reitz, C. & Mayeux, R. (2009) Endophenotypes in normal brain morphology and Alzheimer's disease: a review. *Neuroscience.*,164,174-90.
- Rojas, W., Parra, M. V., Campo, O., Caro, M. A., Lopera, J. G., Arias, W. et al. (2010). Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. *Am J Phys.Anthropol.*, 143, 13-20.
- Roses, A.D. (1996) Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med.*, 47, 387-400.
- Rousset, F. & Raymond, M. (1995). Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, 140, 1413-9.
- Rousset, F. (2008). GenePop'007: a complete re-implementation of the GenePop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Rozen.S & Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>.

-
- Ryckman, K. & Williams, S.M. (2008) Calculation and use of the Hardy-Weinberg model in association studies. *Curr Protoc Hum Genet.*, Chapter 1:Unit 1.18.
- Sagoo, G.S., Little, J., Higgins, J.P. (2009). Systematic reviews of genetic association studies. *PLoS Med.* 6, e28.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230, 1350-4.
- Schaid, D.J., Rowland, C.M., Tines, D.E., Jacobson, R.M. & Poland, G.A. (2002). Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet.*, 70, 425-34.
- Selkoe, D. (2001). Presenilins, b-amyloid precursor protein and the molecular basis of Alzheimer's disease. *Clinical Neuroscience Research*, 1, 91-103.
- Selkoe, D. J. & Wolfe, M. S. (2007). Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell*, 131, 215-221.
- Service, S., DeYoung, J., Karayiorgou, M., Roos, J.L., Pretorius, H., Bedoya, G. et al. (2006). Magnitude and distribution of linkage disequilibrium in population isolates and implications for genome-wide association studies. *Nat Genet.*, 38, 556-60.
- Serretti, A., Olgiati, P., & De Ronchi, D. (2007). Genetics of Alzheimer's disease. A rapidly evolving field. *J Alzheimers.Dis.*, 12, 73-92.
- Shah, S., Lee, S. F., Tabuchi, K., Hao, Y. H., Yu, C., LaPlant, Q. et al. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*, 122, 435-447.
- Shi, J., Zhang, S., Tang, M., Liu, X., Li, T., Wang, Y. et al. (2004). The 1239G/C polymorphism in exon 5 of BACE1 gene may be associated with sporadic Alzheimer's disease in Chinese Hans. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 124B, 54-7.
- Shriver, M. D., Parra, E. J., Dios, S., Bonilla, C., Norton, H., Jovel, C. et al. (2003). Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum.Genet.*, 112, 387-399.
- Skotte, N. (2010). Genome-wide association studies identify new interesting loci for late-onset Alzheimer's disease. *Clin.Genet.*, 77, 330-332.
- Sloane, P. D., Zimmerman, S., Suchindran, C., Reed, P., Wang, L., Boustani, M. et al. (2002). The public health impact of Alzheimer's disease, 2000-2050: potential implication of treatment advances. *Annu.Rev.Public Health*, 23, 213-231.
- Small, S. A. & Gandy, S. (2006). Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron*, 52, 15-31.
- Small, S. A. & Duff, K. (2008). Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron*, 60, 534-542.
- Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 22,1928-9.
- Steiner, H., Flührer, R., & Haass, C. (2008). Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem*, 283, 29627-29631.
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S. et al. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90, 1977-1981.
- Tanzi, R. E., Moir, R. D. & Wagner, S. L. (2004). Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron*, 43, 605-608.
- Tanzi, R. E. & Bertram, L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, 120, 545-555.
- Tanzi, R.E. 2012. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2, a006296.
- Thies W, Bleiler L; Alzheimer's Association. (2013). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dement.*, 9, 208-45.
- Turner, A. J., Fisk, L., & Nalivaeva, N. N. (2004). Targeting amyloid-degrading enzymes as therapeutic strategies in neurodegeneration. *Ann.N.Y Acad.Sci.*, 1035, 1-20.
- Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M., & Butterfield, D. A. (2000). Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct.Biol.*, 130, 184-208.
- Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., & Wong, P. C. (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci.*, 29, 12787-12794.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291, 1304-1351.
- Wan, H. I., Hurko, O., Day, M., & Rutkowski, J. L. (2009). Translational medicine perspective in development of disease modifying therapies for Alzheimer's disease: biomarkers to buy down the risk. *Drug Dev Res*, 70, 60-69.
- Wan, Y., Wang, G., & Chen, S. D. (2008). Genetic predisposition to inflammation: a new risk factor of Alzheimer's disease. *Neurosci.Bull.*, 24, 314-322.

- Wang, B., Zhou, S., Yang, Z., Xie, Y. C., Wang, J., Zhang, P. et al. (2008). Genetic analysis of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) G-308A and Saitohin Q7R polymorphisms with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, 270, 148-151.
- Wang, X., Luedeking, E. K., Minster, R. L., Ganguli, M., DeKosky, S. T., & Kamboh, M. I. (2001). Lack of association between alpha2-macroglobulin polymorphisms and Alzheimer's disease. *Hum. Genet.*, 108, 105-108.
- Wang, X. P. & Ding, H. L. (2008). Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neurosci. Bull.*, 24, 105-109.
- Weisgraber, K. H., Rall, S. C., Jr., & Mahley, R. W. (1981). Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem.*, 256, 9077-9083.
- Wigginton, J.E., Cutler, D.J. & Abecasis, G.R. (2005) A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet.*, 76, 887-93.
- Willem, M., Lammich, S. & Haass, C. (2009). Function, regulation and therapeutic properties of beta-secretase (BACE1). *Semin Cell Dev Biol.*, 20, 175-182.
- World Health Organization (WHO). (2006). Neurological disorders: public health challenges. WHO editors. Geneva, Switzerland. 232pp.
- World Health Organization (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> Accesada el 31 de Marzo del 2013)
- World Health Organization and Alzheimer's Disease International, 2012. Dementia: a public health priority. London, UK. 112pp
- Zekraoui, L., Lagarde, J.P., Raisonnier, A., Gérard, N., Aouizérate, A. & Lucotte G. (1997) High frequency of the apolipoprotein E *4 allele in African pygmies and most of the African populations in sub-Saharan Africa. *Hum Biol.* 69, :575-81.
- <http://www.healthmetricsandevaluation.org/gbd/visualizations/gbd-2010-leading-causes-and-risks-region-heat-map> Accessed [31/03/2013].