



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**“ANALISIS DE POLIMORFISMOS DE GENES RELACIONADOS CON  
LA REPARACIÓN DEL DNA, LA APOPTOSIS, LA AUTOFAGIA Y  
GEN PRNP EN PACIENTES CON DEMENCIA VASCULAR Y  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

**TESIS DOCTORAL**

**MIRIAM ALVAREZ ALVAREZ**

**2019**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
UNIDAD DE MEDICINA MOLECULAR



**“ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE GENES RELACIONADOS CON LA REPARACIÓN DEL DNA, LA APOPTOSIS, LA AUTOFAGIA Y GEN PRNP EN PACIENTES CON DEMENCIA VASCULAR Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

**Autora:** Dra. Miriam Álvarez Álvarez

**Tutores:** Dra. Raquel Manso Calderón, Dr. Rogelio González Sarmiento

**Director:** Dr. Rogelio González Sarmiento

## CERTIFICACIÓN

**D./D<sup>a</sup> Rogelio González Sarmiento**, Catedrático de Universidad del *Departamento de Medicina* y como *Coordinador del Programa de Doctorado en Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional* de la Universidad de Salamanca, ACEPTA ser el director y tutor de la tesis doctoral de **Dña. Miriam Álvarez Álvarez** y solicita preinscripción en dicho programa

Y para que conste a los efectos oportunos, se firma la presente en:

Salamanca 24 de enero de 2017



**D. Rogelio González Sarmiento.**

Coordinador del *Programa de Doctorado en Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional*

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis doctoral no habría sido posible sin la ayuda y el apoyo de muchísimas personas. A través de estas líneas me gustaría poder demostrarles a todos mi más profundo agradecimiento.

Al Dr. Rogelio González Sarmiento, director de esta tesis, y a la Dra. Raquel Manso Calderón, tutora de la misma, por la confianza depositada en mí y por su ayuda para que este proyecto se llevara a cabo.

A todos y a cada uno de los componentes del Servicio de Neurología del Complejo Asistencial de Salamanca (tanto médicos como enfermería); vosotros me habéis enseñado todo lo que a día de hoy soy como profesional. En especial, a mí siempre eterna “resi mayor” Irene por aguantar y responder todas mis dudas y a mi “resi peque” Sandra por ser una de las personas que mejor me ha llegado a comprender. Y a ti, Javi, porque siempre estarás conmigo.

No podría olvidarme de todas aquellas personas del laboratorio de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, sobre todo a Ricardo, por su eterna paciencia y humor, y a Alicia, neuróloga excepcional, y a la que debo parte de este trabajo.

A vosotras, “marsupiales” por haberme enseñado a viajar en todos los sentidos, gracias por todo.

Finalmente, a mi familia, a mis padres por ser el mejor ejemplo de honestidad y amor, así como por ser un apoyo indiscutible y ciego en los peores momentos. A mi hermana Raquel, por ser mi otra mitad, mi complemento y uno de mis principales apoyos.

Y a ti, mi más bonita coincidencia, y sin quien nada sería lo mismo.



# ÍNDICE

# ÍNDICE

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

<b>1. DEMENCIAS.....</b>	<b>12</b>
1.1 CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN.....	12
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	13
1.3 DEMENCIA VASCULAR.....	15
1.4 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	25
1.4.1: EA FAMILIAR.....	39
1.4.1.1: EA familiar por mutación en presenilina (14q.24.3) y presenilina 2 (1q42.1).....	29
1.4.1.2: EA familiar por mutación de la proteína precursora de amiloide (21q.21.3-q22.05).....	30
1.4.2: EA ESPORÁDICA.....	30
<b>2. POLIMORFISMOS DE GENES REPARADORES DEL DNA, AUTOFAGIA, APOPTOSIS Y PROTEÍNA PRIÓNICA.....</b>	<b>32</b>
2.1 GENES REPARADORES DE DNA.....	32
2.1.1 REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS.....	33
2.1.2 REPRACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES.....	34
2.1.3 REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA.....	35
2.1.4 REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS.....	37
2.2 POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON GENES REPARADORES DE DNA.....	38
2.2.1 <i>XRCC1</i> Arg399Gln (rs25487).....	38
2.2.2 <i>ERCC2</i> Lys751Gln (rs13181).....	40
2.2.3 <i>XRCC3</i> Thr241Met (rs861539).....	41
2.3 POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN <i>TP53</i> (rs1042522).....	42
2.3.1: <i>TP53</i> Y DEMENCIA.....	44

2.4 AUTOFAGIA.....	45
2.4.1 AUTOFAGIA Y DEMENCIA.....	49
2.5 POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA.....	52
2.5.1 <i>ATG2B</i> Gln1383Glu (rs3759601).....	52
2.5.2 <i>ATG16L1</i> Thr300Ala (rs2241880) .....	52
2.5.3 <i>ATG10</i> Thr212Met (rs1864483).....	52
2.5.4 POLIMORFISMO INTRÓNICO DEL GEN <i>ATG5</i> g.10621860 C>G (rs2245214)..	52
2.6 POLIMORFISMO Met129Val DEL GEN <i>PrNP</i> (rs1799990).....	53
2.6.1 PrPC y desarrollo neurítico.....	54
2.6.2 PrPC y sinapsis.....	54
2.6.3 PrPC y neuroprotección.....	55
2.7 PrPN Y DEMENCIA.....	56

## **CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

<b>1. HIPÓTESIS.....</b>	<b>61</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
2.1 PRIMARIOS.....	63
2.2 SECUNDARIOS.....	63

## **CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS**

<b>1. DISEÑO Y ÁMBITO DEL ESTUDIO.....</b>	<b>65</b>
<b>2. MUESTRA.....</b>	<b>65</b>
2.1 PACIENTES.....	65
2.2 CONTROLES.....	67
<b>3. ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>67</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>68</b>
4.1 RECOGIDA DE DATOS.....	68
4.1.1 Datos de identificación y sociodemográficos.....	68
4.1.2 Datos clínicos.....	69

4.1.3	Variables calculadas.....	70
4.1.4	Pruebas complementarias.....	72
<b>5.</b>	<b>ESTUDIO GENÉTICO.....</b>	<b>74</b>
5.1	OBTENCIÓN DEL DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.....	74
5.2	ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES (relacionados con la autofagia, reparación del DNA, <i>TP53</i> , <i>PrNP</i> y <i>APOE ε4</i> ).....	75
5.2.1	Discriminación alélica mediante RFLP.....	75
5.2.2	Discriminación alélica mediante QRT-PCR.....	76
<b>6.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>

#### CAPÍTULO 4: RESULTADOS

<b>1.</b>	<b>DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA EMPLEADA PARA EL ANÁLISIS DE LOS GENES REPARADORES DE DNA, AUTOFAGIA Y PROTEÍNA PRIÓNICA.....</b>	<b>85</b>
<b>2.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA MUESTRA.....</b>	<b>85</b>
2.1	SEXO.....	85
2.2	EDAD.....	88
2.3	NIVEL EDUCATIVO.....	90
2.4	FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	92
2.5	HÁBITOS TÓXICOS.....	95
<b>3.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON DEMENCIA.....</b>	<b>96</b>
3.1	EVALUACIÓN DE LA DEMENCIA.....	96
3.2	POLIMORFISMO APOE.....	102
<b>4.</b>	<b>ANÁLISIS DE LAS VARIABLES GENÉTICAS.....</b>	<b>105</b>
4.1	GENES REPARADORES DE DNA.....	105
4.1.1	Estudio comparativo del polimorfismo Arg399Gln de <i>XRCC1</i> entre Enfermedad de Alzheimer y controles.....	105
4.1.2	Estudio comparativo entre el polimorfismo Lys751Gln de <i>ERCC2</i> entre Enfermedad de Alzheimer y controles.....	107
4.1.3	Estudio comparativo entre el polimorfismo Thr241Met de <i>XRCC3</i> entre Enfermedad de Alzheimer y controles.....	109
4.1.4	Análisis de la relación entre genes reparadores del DNA y progresión en Enfermedad de Alzheimer.....	111
4.1.5	Estudio comparativo entre el polimorfismo Arg399Gln de <i>XRCC1</i> entre Demencia Vasculare y controles.....	114

4.1.5.1 Estudio comparativo entre el polimorfismo Arg399Gln del gen <i>XRCC1</i> entre subtipo de Demencia Vascolar.....	116
4.1.6 Estudio comparativo entre el polimorfismo Lys751Gln del gen <i>ERCC2</i> entre Demencia Vascolar y controles.....	119
4.1.6.1 Estudio comparativo entre el polimorfismo Lys751Gln del gen <i>ERCC2</i> entre subtipo de Demencia Vascolar.....	120
4.1.7 Estudio comparativo entre el polimorfismo Thr241Met del gen <i>XRCC3</i> entre Demencia Vascolar y controles.....	123
4.1.7.1 estudio comparativo entre el polimorfismo Thr241Met del gen <i>XRCC3</i> entre subtipos de Demencia Vascolar.....	125
4.2 POLIMORFISMO Met129Val DEL GEN <i>PrNP</i> (1799990).....	129
4.2.1 Estudio comparativo del polimorfismo Met129Val del gen <i>PrNP</i> entre Enfermedad de Alzheimer y controles.....	129
4.2.2 Análisis de la relación entre el polimorfismo Met129Val del gen <i>PrNP</i> y progresión de la Enfermedad de Alzheimer.....	131
4.3 ANÁLISIS GENÉTICO DE GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA.....	133
4.3.1 Estudio comparativo entre el polimorfismo Thr300Ala del gen <i>ATG16L1</i> entre Enfermedad de Alzheimer y controles.....	133
4.3.2 Estudio comparativo entre el polimorfismo intrónico del gen <i>ATG5</i> entre Enfermedad de Alzheimer y controles.....	134
4.3.3 Estudio comparativo entre el polimorfismo Thr212Met del gen <i>ATG10</i> entre Enfermedad de Alzheimer y controles.....	136
4.3.4 Estudio comparativo entre el polimorfismo Gln1383Glu del gen <i>ATG2B</i> entre Enfermedad de Alzheimer y controles.....	137
4.3.5 Análisis de la relación entre genes relacionados con autofagia y progresión de la Enfermedad de Alzheimer.....	138
4.3.6 Estudio comparativo entre el polimorfismo Thr300Ala del gen <i>ATG16L1</i> entre Demencia Vascolar y controles.....	143

4.3.6.1 <i>Estudio comparativo entre el polimorfismo Thr300Ala del gen ATG16L1 entre subtipos de Demencia Vascolar.....</i>	145
4.3.7 Estudio comparativo entre el polimorfismo intrónico g.10621860 C>G del gen ATG5 entre Demencia Vascolar y controles.....	148
4.3.7.1 <i>Estudio comparativo entre el polimorfismo intrónico del gen ATG5 entre subtipos de Demencia Vascolar.....</i>	149
4.3.8 Estudio comparativo entre el polimorfismo Thr212Met del gen ATG10 entre demencia vascular y controles.....	152
4.3.8.1 <i>Estudio comparativo entre el polimorfismo Thr212Met del gen ATG10 entre subtipos de Demencia Vascolar.....</i>	153
4.3.9 Estudio comparativo entre el polimorfismo Gln1383Glu del gen ATG2B entre Demencia Vascolar y controles.....	156
4.3.9.1 <i>Estudio comparativo entre el polimorfismo Gln1383Glu del gen ATG2B entre subtipo de Demencia Vascolar.....</i>	158
<b>5. ANÁLISIS GENÉTICO DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN TP53.....</b>	<b>161</b>
5.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA EMPLEADA PARA EL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN TP53.....	161
5.2 ANÁLISIS GENÉTICO DE POLIMORFISMO Arg75Pro DEL GEN TP53.....	162
5.2.1 Estudio comparativo del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 entre Enfermedad de Alzheimer y controles.....	162
5.2.2 Análisis de la relación entre el polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 y progresión en Enfermedad de Alzheimer.....	164
5.2.3 Estudio comparativo del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 entre Demencia Vascolar y controles.....	166
5.4.3.1 <i>Estudio comparativo del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 entre subtipos de Demencia Vascolar.....</i>	167

## **CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN**

<b>1. ASPECTOS GENERALES.....</b>	<b>172</b>
<b>2. ESTUDIO CLÍNICO.....</b>	<b>172</b>
2.1 ESTUDIO DE VARIABLES NO GENÉTICAS. INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN EL DESARROLLO DE DEMENCIA.....	172
2.2 ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA DEMENCIA.....	182
<b>3. ESTUDIO GENÉTICO.....</b>	<b>184</b>
3.1 ASPECTOS GENERALES.....	184
3.2 GENES REPARADORES DE DNA.....	185
3.2.1 Análisis del polimorfismo Arg399Gln de <i>XRCC1</i> (rs1799782).....	185
3.2.2 Análisis del polimorfismo Lys751Gln de <i>ERCC2</i> (rs13181).....	188
3.2.3 Análisis del polimorfismo Thr241Met de <i>XRCC3</i> (rsrs1799794).....	190
3.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Met129Val DEL GEN <i>PrNP</i> (rs17999990).....	192
3.4 GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA.....	195
3.5 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN LA PROTEÍNA SUPRESORA TUMORAL P53.....	199
<b>4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE GENES REPARADORES DE DNA, <i>PrNP</i>, AUTOFAIA Y <i>TP53</i> Y PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....</b>	<b>203</b>
4.1 GENES REPARADORES DE DNA.....	204
4.2 GEN <i>PrNP</i> .....	205
4.3 GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA.....	206
4.4 GEN <i>TP53</i> .....	207
4.5 ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA.....	207
<b>5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....</b>	<b>209</b>
<b>6. DIRECTRICES PARA FUTUROS ESTUDIOS.....</b>	<b>210</b>
<b><u>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....</u></b>	<b>212</b>
<b><u>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....</u></b>	<b>214</b>
<b><u>CAPÍTULO 8: ANEXOS.....</u></b>	<b>235</b>

# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1. DEMENCIAS

#### 1.1 CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN:

La demencia es un síndrome clínico que se caracteriza por un deterioro de las funciones intelectuales (de al menos dos de las siguientes: la memoria, lenguaje, gnosis, praxias o función ejecutiva) adquiridas previamente, con preservación del nivel de conciencia, que interfiere en el rendimiento laboral o social del individuo y le hace perder su autonomía personal (1).

Los criterios diagnósticos de demencia del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5ª edición, (DSM-V) (2) y de la Clasificación Internacional de Enfermedades 10ª edición (CIE-10) (3) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) son clasificaciones categoriales, de todo o nada, que definen la presencia o ausencia de enfermedad, y demasiado ajustadas al “paradigma cognitivo” con exclusión de los síntomas psiquiátricos como propios de la enfermedad. Sin embargo, los criterios de la *National Institute on Aging and Alzheimer’s Association* (NIA-AA) (4) incluyen en su clasificación los síntomas psicológicos y conductuales de la demencia como uno de los posibles criterios diagnósticos, lo cual es un importante paso adelante. (Tabla 1).

<b>Tabla 1: Criterios diagnósticos de la NIA-AA para el diagnóstico de demencia (4)</b>
Se diagnostica demencia cuando hay síntomas cognitivos o conductuales que:
1- Interfieren con la capacidad de funcionar normalmente en el trabajo o en las actividades habituales
2. Suponen un deterioro con respecto a los niveles de rendimiento y funcionamiento previos
3. No se explican por la presencia de delirium o de un trastorno psiquiátrico mayor
4. Se detectan y diagnostican por la combinación de la historia clínica obtenida en la entrevista con el paciente y un informador que lo conoce, y la valoración objetiva del estado mental, bien sea una evaluación neuropsicológica formal o una evaluación cognitiva en la cabecera del paciente
5. La alteración cognitiva o conductual involucra al menos dos de los cinco siguientes aspectos: a) Capacidad alterada de adquirir y recordar nueva información b) Alteración o cambios en el razonamiento, manejo de tareas complejas o capacidad de juicio c) Alteración de las capacidades perceptivas y visuoespaciales d) Alteración de las funciones del lenguaje e) Cambios de personalidad o en el comportamiento

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

A la hora de clasificar los tipos de demencia es habitual considerar tres grandes categorías etiológicas: demencias degenerativas, secundarias y mixtas. (Tabla 2)(5)

<b>Tabla 2: Clasificación de las demencias (adaptada de la guía SEN, 2009)</b>
<b>1. Demencias degenerativas primarias</b>
<b>1.a Enfermedades degenerativas en las que la demencia es una de las manifestaciones principales</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Enfermedad de Alzheimer</li><li>- Demencia por cuerpos de Lewy</li><li>- Degeneración lobular frontotemporal</li><li>- Demencias por priones</li><li>- Otras demencias infrecuentes</li></ul>
<b>1.b Enfermedades degenerativas en las que la demencia puede formar parte del cuadro clínico</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Corea de Huntington</li><li>- Degeneración corticobasal</li><li>- Parálisis supranuclear progresiva</li><li>- Enfermedad de Parkinson</li><li>- Enfermedad de motoneurona</li></ul>
<b>2. Demencias secundarias</b>
<b>2.1 Demencias vasculares (DV)</b>
<b>2.1.a Isquémicas</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Demencia multiinfarto</li><li>- Demencia por infarto estratégico</li><li>- Leucoencefalopatía subcortical arterioesclerótica</li><li>- Estado lacunar</li><li>- Angiopatías hereditarias</li><li>- Angiopatía hipertensiva y arterioesclerótica</li><li>- Vasculitis</li></ul>
<b>2.1.b Isquémicas hipóxicas</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Encefalopatía difusa anóxico-isquémica o restringida debido a vulnerabilidad selectiva</li><li>- Infartos incompletos de la sustancia blanca</li><li>- Infartos de zonas fronterizas</li></ul>
<b>2.1.c Hemorrágicas</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Hematoma cerebral</li><li>- Angiopatía amiloidea</li><li>- Hematoma subdural crónico</li><li>- Hemorragia subaracnoidea</li></ul>
<b>2.2 Otras demencias secundarias</b>
<b>3. Demencias combinadas o de etiología múltiple</b>

## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA

En las últimas décadas, se ha producido un gran cambio demográfico debido al incremento de la expectativa de vida media asociado a una drástica reducción de la natalidad. Este cambio ha producido que el porcentaje de individuos de edad avanzada respecto al conjunto de la

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

población se incrementa a gran velocidad, haciendo que las necesidades de cuidados de todo tipo de este segmento creciente de población planteen grandes desafíos presupuestarios y organizativos para los gobiernos y, en especial, para los sistemas sociales y sanitarios. (1)

En España continúa el proceso de envejecimiento. Así, a 1 de enero de 2014, los datos del Padrón Continuo indican que había 8.442.427 personas mayores de 65 años, suponiendo el 18,1% sobre el total de la población (46.771.341) (6). Según la proyección del INE, en 2061 habrá más de 16 millones de personas de edad mayor o igual a 65 años (38,7% del total).

La demencia afecta a nivel mundial a unos 47 millones de personas, de las cuales alrededor del 60% viven en países de ingresos bajos y medios. A lo largo de 2015 han aparecido 9,9 millones de casos de demencia nuevos en todo el mundo, uno cada 3 segundos. Se calcula que entre un 5% y un 8% de la población general de 60 años o más sufrirá demencia en un determinado momento. Se prevé que el número total de personas con demencia prácticamente pase a cerca de 75 millones en 2030 y a casi el triple en 2050 (132 millones). Buena parte de ese incremento puede achacarse al hecho de que, en los países de ingresos bajos y medios, el número de personas con demencia tenderá a aumentar cada vez más. (7)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la primera causa de demencia, seguida de la demencia vascular (DV). Según estudios europeos, un 53,7% de las demencias son de tipo EA frente a un 15,8% que supone la DV (Figura 1) (8).

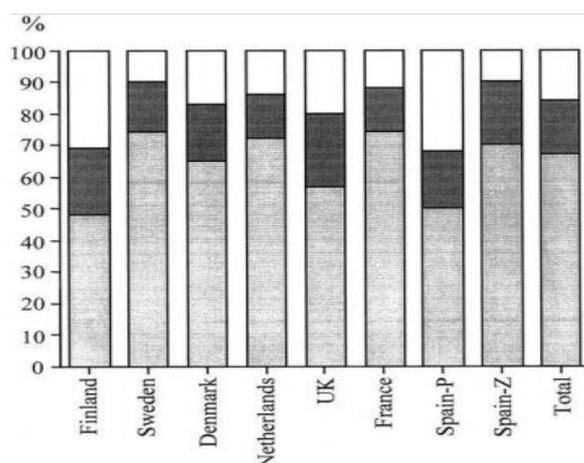


Figura 1. **Gris: EA, Negro: DV, Blanco: otras** Representación porcentual de los distintos tipos de demencia en un estudio multicéntrico europeo (8)

La tercera causa de demencia es la demencia con cuerpos de Lewy, y la cuarta, la degeneración lobular frontotemporal, que representan el 10-15% y el 3-4% respectivamente de todas las demencias en series de autopsias.

En España, datos recientes del Grupo Epidemiológico Español sobre Envejecimiento muestran una prevalencia de demencia en población general mayor de 70 años del 8,2%; el 57,2% de los casos de demencia correspondían a EA y el 18,9% a DV, lo que supone unas tasas de prevalencia de 4,7% y 1,6%, respectivamente. (9)

Los factores más significativos como predictores de mortalidad en pacientes con demencia son la edad de inicio más tardía, el mayor deterioro cognitivo y el sexo masculino. La edad influye disminuyendo la esperanza de vida desde 10 años, cuando la enfermedad se presenta entre los 65 y los 69 años, hasta 3,9 años en los mayores de 90. En cuanto al sexo, la supervivencia es mayor en mujeres que en hombres. Por otro lado, la gravedad de la demencia es un factor de riesgo de mortalidad; ya que se ha observado un paralelismo entre el grado de alteración cognitiva medido por el Mini examen del Estado Mental (MMSE) y el tiempo de supervivencia. También se han observado diferencias en cuanto a la mortalidad según el tipo de demencia: la mortalidad es menor en la EA que en la DV; con un tiempo medio de supervivencia de 3,1 años y 2,8 años, respectivamente. (10).

## 1.3 DEMENCIA VASCULAR

La DV se define como el deterioro de funciones cognitivas debido a lesiones cerebrales isquémicas o hemorrágicas, o a una combinación de ambas. La DV puede presentarse de forma aguda o subaguda como consecuencia de uno o varios ictus, pero también puede hacerlo de forma insidiosa y progresiva.

El espectro de la DV representa el 15-20% de todas las formas de demencia, suponiendo la segunda causa más frecuente tras la EA. Los estudios epidemiológicos realizados en España sobre la prevalencia de DV son escasos y presentan diferencias metodológicas. Así, la prevalencia oscila desde el 1,2% de los estudios del Prat y Zardemp al 5,1% en Gerona. (11)

La DV es multifactorial ya que el daño cerebral deriva, por un lado, de la isquemia y de la anoxia, y, por otro, de factores bioquímicos cuyos efectos deletéreos sobre el cerebro a través de procesos inflamatorios, metabólicos o de otro tipo todavía se desconocen. (1)

El diagnóstico definitivo de las DV es neuropatológico. Sin embargo, no existe un patrón oro para diagnóstico neuropatológico de la DV. La heterogeneidad en cuanto al tipo, tamaño, número y localización de las lesiones es muy amplia; y cualquier lesión vascular del cerebro,

sea isquémica o hemorrágica, es capaz de producir un deterioro cognitivo, dependiendo del número y su localización.

Lo habitual es que la DV se asocie a: infartos arteriales grandes córtico-subcorticales, a infartos lacunares y/o a desmielinización subcortical (leucoencefalopatía isquémica). (12)

Los infartos arteriales grandes córtico-subcorticales producen lesiones cavitadas en las regiones de la arteria que irriga la zona infartada y suelen afectar tanto a la corteza como a la región subcortical subyacente.

Los infartos lacunares son lesiones cavitadas de menos de 1,5 cm que aparecen en territorios subcorticales de las arterias perforantes. En general, los infartos lacunares aislados no producen deterioro cognitivo, aunque en ocasiones pueden producir efectos cognitivos extensos desproporcionados a su pequeño tamaño por el fenómeno de diasquisis y por los efectos de desconexión interhemisférica de los circuitos córtico-subcorticales. (1) Esto ocurre, por ejemplo, en los infartos en territorios críticos de la arteria cerebral anterior o posterior que afectan bilateralmente al tálamo. La presencia de múltiples lesiones lacunares se conoce como “estado lacunar”. La patología isquémica subcortical en forma de “estado lacunar” a nivel de los ganglios basales y de la sustancia blanca por aterosclerosis grave ha sido ampliamente descrita como causa de deterioro cognitivo vascular.

La leucoencefalopatía isquémica se caracteriza por áreas de desmielinización y pérdida axonal en la sustancia blanca, con aspecto parcheado o parcheado-confluyente, que afectan por igual a ambos hemisferios. La entidad en la que se combinan lagunas y leucoencefalopatía se ha denominado “encefalopatía subcortical arteriosclerótica” o “enfermedad de Binswanger”.

Además de las lesiones neuropatológicas descritas, existen otros hallazgos anatomopatológicos que se relacionan con DV. Es el caso de la esclerosis del hipocampo o la necrosis lacunar, que se produce por estados hipóxicos o por hipoperfusión global, y que puede dar lugar, sobre todo si es bilateral, a trastornos en la memoria.

Otra entidad a tener en cuenta es la atrofia granular cortical, que se atribuye a la existencia de infartos microscópicos en la corteza, y se asocia a microangiopatía amiloide, algunas vasculitis o microembolias múltiples. (13)

La clasificación clínico-patológica de las DV es difícil por la gran variedad de presentaciones que puede haber. En la siguiente tabla (tabla 3), se resumen los 5 tipos de presentación clínico-patológica más frecuentes.

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Clasificación clínico-patológica de las DV			
TIPO DE DV	MECANISMO	INSTAURACIÓN	CLÍNICA
<b>DV MULTINFARTO</b>	Acumulación de infartos múltiples en zonas de arterias de mediano-gran calibre	Inicio agudo y empeoramiento con nuevos eventos	Afectadas áreas de lenguaje, praxias, funciones visuoespaciales, cálculo y memoria
<b>DV SUBCORTICAL</b>	Múltiples infartos lacunares, afectación de pequeño vaso	Instauración insidiosa, curso lento y progresivo	Disfunción ejecutiva, trastorno de la atención/ concentración, alteración de la motivación (apatía), trastorno de la memoria y del control motor
<b>DV POR INFARTO ESTRATÉGICO</b>	Por afectación de zonas elocuentes	Inicio agudo/subagudo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tálamo posterior bilateral: amnesia, heminegligencia y afasia</li> <li>- Rodilla cápsula interna, tálamo anterior, núcleo caudado bilateral: demencia frontal</li> </ul>
<b>DV POR HIPOPERFUSIÓN Y/O ANOXIA</b>	Hipotensión arterial, hipoglucemias, hipoxia...	Inicio agudo/subagudo	De diferente duración e intensidad según causa: desde pequeños errores mnésicos hasta estado vegetativo persistente o fallecimiento
<b>DV POR HEMORRAGIA CEREBRAL</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Intraparenquimatosa (por HTA): afectación de ganglios de la base</li> <li>- Angiopatía amiloidea: lobar</li> <li>- Hemorragia subaracnoidea</li> </ul>	Inicio subagudo/crónico	Alteraciones motoras y/o sensitivas, apraxias...

Para el diagnóstico de la DV se han propuesto diferentes escalas y criterios, que se encuentran en constante revisión, con la finalidad de conseguir una mejor definición y estratificación de la DV. Cada vez se conocen más datos sobre la DV, lo que nos permite un mejor conocimiento de la misma así como el desarrollo de escalas y criterios más adecuados.

La DSM-V, en su nueva versión (tabla 4), estableció una serie de cambios respecto a su anterior edición. En la nueva edición intenta minimizar el uso de la categoría "no especificado" y hace hincapié en la necesidad de identificar la supuesta causa subyacente del síndrome. Por lo tanto, el primer paso en el proceso diagnóstico es diferenciar entre "función neurocognitiva normal" y "trastorno neurocognitivo (TN) leve y mayor", seguido de un segundo paso para asignar una categoría etiológica, por ejemplo, TN por EA, TN de origen vascular o por enfermedad con cuerpos de Lewy. Para distinguir entre los subtipos etiológicos, se requieren marcadores diagnósticos adicionales, como estudios de neuroimagen (resonancia magnética (RM) y tomografía por emisión de positrones) y otros biomarcadores. No obstante, algunos estándares de neuroimagen y otros biomarcadores no se encuentran a disposición de todos los centros, haciendo que a día de hoy estos criterios sean poco aplicables en la práctica clínica diaria. (14)

**Tabla 4. Criterios de la DSM V para diagnóstico de trastorno neurocognitivo vascular (2)**

- A.** Se cumplen los criterios de un trastorno neurocognitivo leve o mayor.
- B.** La sintomatología clínica es compatible con una etiología vascular como lo sugiere cualquiera de los siguientes criterios:
  1. El inicio de los déficits cognitivos presenta una relación temporal con uno o más eventos cerebrovasculares.
  2. Las evidencias del declive son notables en la atención compleja (incluida la velocidad de procesamiento) y en la función frontal ejecutiva.
- C.** Existen evidencias de la presencia de una enfermedad cerebrovascular (ECV) en la anamnesis, en la exploración física o en el diagnóstico por neuroimagen, consideradas suficientes para explicar los déficit cognitivos.
- D.** Los síntomas no se explican mejor por otra enfermedad cerebral o trastorno sistémico.

También establece la categoría de “probable” y “posible” en el caso de que no se cumplan los criterios establecidos.

Entre las diferentes escalas y criterios diagnósticos los más conservadores, es decir, los que menos falsos positivos producen, son los criterios de NINDS-AIREN. Estos establecen grados de probabilidad diagnóstica y permiten formular un diagnóstico de DV probable o posible. El diagnóstico de DV posible puede realizarse en ausencia de datos de neuroimagen o cuando no puede establecerse una relación temporal entre el inicio del deterioro cognitivo y un evento vascular. Este dato es particularmente importante para las formas subcorticales de DV, en las cuales el curso de la demencia puede ser muy semejante al de las demencias degenerativas primarias. (13)

**Tabla 5. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE DV DE NINDS-AIREN (10)**

1. Criterios obligatorios para diagnosticar **demencia vascular probable**:
  1. Demencia: Deterioro respecto al nivel previo de la memoria y al menos otras dos funciones cognitivas (orientación, atención, lenguaje, funciones visoespaciales, funciones ejecutivas, control motor, praxias), suficiente como para interferir en las actividades diarias (independientemente de lo que interfieran las deficiencias físicas). Se excluyen pacientes con alteración del nivel de conciencia, síndrome confusional agudo, psicosis, afasia intensa o alteración sensitivo-motora notable que impidan la objetivación adecuada de las alteraciones neuropsicológicas. También se excluyen los pacientes con alteraciones sistémicas u otras enfermedades cerebrales (como la Enfermedad de Alzheimer) que por sí mismas pudieran explicar las alteraciones cognitivas.
  2. Enfermedad cerebrovascular (ECV), demostrada a través de signos focales congruentes con ictus previo, con o sin relato de ictus previo, y evidencia de lesiones vasculares en la neuroimagen -TAC o RM- (infartos en territorios de arteria de gran calibre, o de uno solo que afecta a localización estratégica para producir alteraciones cognitivas -circunvolución angular, tálamo, región frontobasal, territorios de arterias cerebrales anterior o posterior-, o infartos lacunares múltiples en ganglios basales y sustancia blanca subcortical o periventricular, o combinaciones de los anteriores).
  3. Relación entre los apartados 1 y 2, inferida a partir de una o más de las siguientes circunstancias:
    - 3.1. Inicio de la demencia en los 3 meses siguientes a un ictus
    - 3.2. Deterioro brusco de funciones cognitivas
    - 3.3. Progresión fluctuante o escalonada de las alteraciones cognitivas

2. Aspectos compatibles con una **demencia vascular probable**:
  1. Alteración de la marcha en fase temprana
  2. Antecedente de inestabilidad y caídas frecuentes
  3. Aparición precoz de aumento de la frecuencia de micción, urgencia urinaria u otras alteraciones del control vesical no explicables por un trastorno urológico.
  4. Parálisis pseudobulbar
  5. Alteraciones en la personalidad o el estado de ánimo, abulia, depresión, labilidad emocional, y otras alteraciones subcorticales como enlentecimiento psicomotor y alteración de funciones ejecutivas.
3. Aspectos **que hacen incierto o improbable el diagnóstico** de demencia vascular:
  1. Trastorno precoz de la memoria y empeoramiento progresivo de la memoria y de otras funciones cognitivas, sin que aparezcan en la neuroimagen lesiones cerebrales focales que lo expliquen
  2. Ausencia de signos neurológicos focales aparte de las alteraciones cognitivas
  3. Ausencia de lesiones cerebrovasculares en TAC o RM
4. Criterios de **demencia vascular posible**:
  1. Demencia (según 1.1), con signos neurológicos focales, en pacientes en los que no podemos disponer de neuroimagen confirmatoria, o en aquellos que no muestran una relación cronológica congruente entre los ictus y la demencia; también en pacientes con evidencia de ECV, en los que la demencia tiene comienzo insidioso o evolución diferente de la esperada (mesetas prolongadas o mejorías)
5. Criterios de **demencia vascular confirmada**:
  1. Criterios clínicos de demencia vascular probable
  2. Evidencia histopatológica de ECV, obtenida a través de biopsia o autopsia.
  3. Ausencia de más ovillos neurofibrilares y placas neuríticas de las esperadas por la edad
  4. Ausencia de otras alteraciones clínicas o anatomopatológicas capaces de explicar la demencia

Por último, la escala de Hachinski se diseñó para predecir la presencia de infartos cerebrales en pacientes con demencia y apoyar el diagnóstico diferencial entre demencia degenerativa por EA y demencia multiinfarto y sigue teniendo un gran valor predictivo: por debajo de 4 es probable que el paciente tenga una enfermedad degenerativa y, por encima de 7, una DV. (15)

Ítems	Puntuación
Comienzo abrupto	2
Progresión escalonada	1
Curso fluctuante	2
Confusión nocturna	1
Personalidad relativamente preservada	1
Depresión	1
Quejas somáticas	1
Incontinencia emocional	1
Historia de hipertensión	1
Historia de ictus	2
Evidencia de aterosclerosis asociada	1
Síntomas neurológicos focales	2
Signos neurológicos focales	2
<b>Escala de Hachinski</b>	
Enfermedad de Alzheimer	0-4
Demencia vascular	7 o más
Casos mixtos o indeterminados	5 o 6

**Figura 2.** Escala isquémica de Hachinski (15)

A pesar de que la DV es la segunda causa de demencia más frecuente, los estudios sobre su base genética son limitados, sobre todo si los comparamos con los estudios llevados a cabo en otras enfermedades neurodegenerativas como la EA o la demencia frontotemporal. Sólo se ha llevado a cabo un estudio, realizado en 24 gemelos, para intentar establecer la relación entre la heredabilidad y la DV. Este estudio no arrojó datos estadísticamente significativos. (15). El estudio de las causas genéticas de DV podría ser una herramienta diagnóstica y fuente de nuevas dianas terapéuticas.

Una de las evidencias más importantes que nos hacen tener en cuenta la base genética de la DV, es la existencia de las formas monogénicas, en las cuales la disfunción de un solo gen puede conducir al desarrollo de la DV.

Existen varias formas monogénicas, que se resumen -con sus principales características- en la tabla 6 (16).

La causa más frecuente de DV monogénica es la arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía, más conocida por su acrónimo inglés CADASIL.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

---

Se trata de una enfermedad autosómica dominante debida a mutaciones en el gen *NOTCH 3* del cromosoma 19 (19q12), la mayor parte se localizan en los exones 3 y 4. Los síntomas comienzan entre los 30 y 50 años y consisten en cefalea tipo migraña, eventos isquémicos subcorticales recurrentes, deterioro cognitivo, alteraciones del estado de ánimo y convulsiones.

Otra forma monogénica, descrita por primera vez en 1989, es la enfermedad de Fabry: una enfermedad lisosomal ligada al cromosoma X atribuible a una mutación del gen *GLA* (Xq22), dando como resultado una ausencia o reducción de la actividad de la galactosidasa que finalmente conduce a la acumulación de glucoesfingolípidos (globotriaosilceramida) en diferentes órganos. Las manifestaciones clínicas son ictus o accidentes isquémicos transitorios de repetición, alteración de la función renal y cardiomiopatía. Los ictus producidos por la enfermedad de Fabry son en su mayoría lacunares, aunque también se han descrito ictus de gran vaso así como de origen cardioembólico.

Otras entidades, ya más raras, son la arteriopatía relacionada con el gen *COL4A1-A2*, o la vasculopatía retiniana asociada a leucodistrofia (RVCL) debida a mutaciones del gen *TREX 1*, de herencia autosómica dominante ambas.

Por último, se encontraría el CARASIL: una entidad rara que cursa con un cuadro clínico, radiológico y neuropatológico similar al CADASIL, pero con herencia autosómica recesiva.

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Tabla 6. Desórdenes monogénicos relacionados con DV					
	CADASIL	ENFERMEDAD DE FABRY	RVCL	COL4A1	CARASIL
<b>GENÉTICA</b>					
Patrón de herencia	Autosómica dominante	Ligada al X	Autosómica dominante	Autosómica dominante	Autosómica recesiva
Gen	<i>NOTCH3</i>	<i>A-GAL (GLA)</i>	<i>TREX1</i>	<i>COL4A1</i>	<i>HTRA1</i>
Locus	19Q12	Xq22	3p21.3-p21.2	13q34	10q25
Gen producido	Receptor NOTCH3	Enzima $\alpha$ -galactosidasa	Exonucleasas específicas del DNA 3`-5`	Colágeno $\alpha$ 1 tipo IV	HTRA1 serina Peptidasa / Proteasa 1
<b>NEUROIMAGEN</b>					
Lesiones en sustancia blanca	+	+	+	+	+
Lesiones lacunares	+	+	+	+	+
Lesiones córtico-subcorticales	-	+	±	-	-
Hemorragia intracerebral	+	+	-	+	+
Aneurismas	-	+	-	+	-

En comparación con estas formas monogénicas, es razonable asumir que la herencia esporádica de la DV es compleja y se relaciona con múltiples alteraciones genéticas que predisponen a la enfermedad. Además, muchos de los factores de riesgo asociados a la DV – por ejemplo, hipertensión, dislipemia o hábito tabáquico- también se encuentran en parte genéticamente determinadas, lo cual complica mucho más el conocimiento de la base genética de la DV esporádica. Las aproximaciones típicas para identificar factores genéticos son los análisis de ligamiento y los estudios de asociación. Los análisis de ligamiento para enfermedades tan complejas han tenido menos éxito en el descubrimiento de determinantes genéticos que los estudios de asociación. (17)

Los genes candidatos para los estudios de asociación en DV incluyen genes relacionados con el ictus, la EA así como genes que intervienen en los mecanismos patogénicos de la DV.

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista fisiopatológico, los genes implicados en el metabolismo lipídico, especialmente la apoproteína E (APOE), han sido los más estudiados en las últimas dos décadas. Múltiples meta-análisis; incluyendo uno reciente que analiza 44 estudios (con 2481 casos y 7490 controles), encontraron una asociación estadísticamente significativa entre los portadores del alelo  $\epsilon 4$  del gen *APOE* y un aumento del riesgo de DV. Sin embargo, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al analizar los alelos  $\epsilon 3$  o  $\epsilon 2$ , ni con el polimorfismo T427C en la región promotora del gen *APOE*.

Dos polimorfismos (Q192R y L55M) del gen *PONI* se asociaron a mayor riesgo de DV en poblaciones indias y francesas, pero estos resultados no pudieron confirmarse en otros estudios llevados cabo en poblaciones europeas.

Asimismo, varios genes implicados en procesos inflamatorios se han relacionado con la DV, incluidos dos polimorfismos del gen *TNF- $\alpha$*  en poblaciones europeas y asiáticas. La asociación entre DV y *TGF- $\beta 1$*  fue descrita en dos estudios asiáticos. Por último, la variante C677T del gen de la metiltetrahidrofolato-reductasa (*MTHFR*), que se relaciona con los niveles de homocisteína, se ha asociado a mayor riesgo de DV en 3 meta-análisis en poblaciones asiáticas, y recientemente ha demostrado tener una fuerte evidencia en poblaciones europeas. (16)

A parte de los estudios de asociación de genes candidatos, también se han realizado los estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide Association Studies*, GWAS). En los últimos años se han llevado a cabo dos GWAS. El primero fue un estudio retrospectivo en población coreana (con 84 DV y 200 controles) que no detectó ninguna asociación genética. El segundo, fue un estudio prospectivo realizado en Holanda (con 670 DV y 5700 controles) que evidenció una asociación entre la variante rs12007229 próxima al receptor androgénico en el cromosoma X y que fue replicado en población alemana (con 221 DV y 213 controles).

Recientemente, una línea de investigación que se ha considerado en investigar los genes que se han identificado a través de GWAS en relación con ictus y EA. (16)

Con respecto al ictus, distintos consorcios internacionales de genética e ictus (*Cohorts of the Heart and Aging Research in Genetic Epidemiology*, CHARGE; el *International Stroke Genetics Consortium*, ISGC; el *NINDS Stroke Genetics Network*, SiGN; y el *Wellcome Trust Case Control Consortium 2*, WTCCC2) han realizado por separado estudios que incluyen a decenas de miles de pacientes con ictus y cientos de miles de controles. Estos estudios encontraron una variante cerca de *FOXF2* que aumenta el riesgo de sufrir un ictus, y de hiperintensidades de la sustancia blanca. Además, varias asociaciones se han descrito en subtipos específicos de ictus, así se relacionaron *TSPAN2* y *HDAC9* con ictus por aterosclerosis de gran vaso, *PITX2* y *ZFX3*

con ictus cardioembólico, y *ALDH2* con ictus de pequeño vaso. A pesar de ello, se desconocen sus implicaciones en la DV.

Del mismo modo, el Proyecto Genómico Internacional del Alzheimer ha identificado varios genes relacionados con EA a través de GWAS, pero no han encontrado asociación con la DV.

No obstante, no todos los genes relacionados con EA encajan en las vías fisiopatológicas de la producción de amiloide o del procesamiento de la proteína tau. De hecho, varios genes se encuentran relacionados con vías cardio-metabólicas, sobre todo APOE, CLU y ABCA7, que se relacionan con el mecanismo lipídico.

Por otra parte, el estudio de los GWAS ha identificado nuevos genes que se relacionan con la enfermedad de pequeño vaso. Así, a través del estudio de 21.000 personas en el consorcio CHARGE, se han encontrado 5 loci que se relacionan con aumento de hiperintensidades de la sustancia blanca. Dichos loci también se encuentran implicados en la EA y en los ictus hemorrágicos. Estos resultados han sido recientemente replicados en otros estudios.

A pesar de que los hallazgos expuestos correlacionan muy bien con la enfermedad de pequeño vaso, se desconoce la influencia que tienen sobre la DV. (16)

## 1.4 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una entidad anatomo-clínica de naturaleza degenerativa y curso progresivo. Se caracteriza clínicamente por causar una demencia y morfológicamente por la presencia de degeneraciones u ovillos neurofibrilares y placas neuríticas o seniles. (18)

A nivel macroscópico, destaca una atrofia de las circunvoluciones cerebrales y la reducción del peso del encéfalo. La atrofia macroscópica suele ser de predominio temporal y en las áreas asociativas frontales y parietales. Sin embargo, cada vez se reconocen más casos -ya descritos en la neuropatología clásica- de EA con un predominio focal, sea simétrico o asimétrico, frontotemporal, parietal u occipital. (1)

A nivel microscópico, destacan dos lesiones elementales: las placas seniles, que se depositan a nivel extracelular y, los ovillos neurofibrilares (ONF), a nivel intracelular.

Las placas seniles son depósitos de amiloide anormales de forma globular, que predominan en el neocórtex frontal y áreas asociativas parietales y temporales. La forma de amiloide depositado se denomina  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y resulta de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP) en la región N-terminal y C-terminal por acción las enzimas  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas,

que producen péptidos A $\beta$  de 39-43 aminoácidos. Se distinguen tres tipos principales de placas seniles: *a)* las placas difusas, que están constituidas por amiloide no fibrilar depositado en el neurópilo; *b)* las placas amiloides con un centro más o menos denso, y *c)* las placas neuríticas, en las que el centro amiloide está rodeado de neuritas distróficas y de una corona de células microgliales y astrocitarias. (1)

Los ONF están formados por la acumulación de filamentos emparejados en hélice que contienen proteína tau fosforilada anormalmente. Estos filamentos se agregan y pliegan y dan lugar a estructuras histológicas variadas, siendo las más típicas en forma de ovillo en el interior de las neuronas. Los ONF aparecen en la corteza transentorrinal, para extenderse posteriormente a hipocampo, amígdala y neocórtex a medida que la enfermedad progresa, y su evolución parece ser independiente de la formación de placas. (19)

Otra lesión elemental frecuente en la EA es la degeneración granulovacuolar, especialmente en las neuronas piramidales del hipocampo. Cada neurona contiene una o varias vacuolas con un pequeño grano denso en su interior. Se cree que se trata de vacuolas autofágicas destinadas a la retirada de proteínas anormales. Los granos están compuestos de proteína tau similar a la de los ONF. (1)

La EA atraviesa diferentes etapas: en la fase de pre-demencia, asintomática, sólo se encuentran las alteraciones morfo-patológicas. Posteriormente, encontraríamos la fase de demencia, la cual define la enfermedad; durante ella, se recorren los estadios de demencia leve, moderada y severa. El curso clínico de la EA es progresivo y puede ser muy prolongado, aunque por lo general no se extiende más de diez años a partir del momento del diagnóstico. La muerte sobreviene por las complicaciones habituales en este tipo de procesos.

El grupo de trabajo del *The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association* (NIA-AA) revisaron en 2011 los criterios diagnósticos para la EA. En los nuevos criterios incluyeron, para el correcto diagnóstico de la enfermedad, estudios neuropsicológicos y marcadores tanto de neuroimagen avanzada como biomarcadores de LCR. Los criterios los podemos encontrar resumidos en la siguiente tabla. (Tabla 7)

**Tabla 7. Criterios del *The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association* (20)**

**A.- La demencia por EA probable se diagnostica cuando el paciente:**

1. Cumple los criterios de demencia (ver Tabla 1) y tiene las siguientes características:
2. Comienzo insidioso. Los síntomas tienen un comienzo gradual en meses a años, y
3. Antecedente claro de empeoramiento de la cognición por informe u observación, y
4. Los trastornos cognitivos iniciales y más prominentes se evidencian en los antecedentes y el examen en una de las siguientes categorías:

a) *trastorno amnésico*: la presentación sindrómica más frecuente de demencia por EA.

b) *trastornos no amnésicos*:

- trastorno del lenguaje
- trastorno visuoespacial
- trastorno ejecutivo y conductual

5. Exclusiones: el diagnóstico de demencia por EA probable **no debe aplicarse** cuando hay evidencia de:

a) ECV concomitante sustancial, definida por una historia de ictus relacionada temporalmente con el inicio o el empeoramiento del deterioro cognitivo, o la presencia de infartos múltiples o extensos o una fuerte carga de hiperintensidades en la sustancia blanca; o

b) características centrales de demencia con cuerpos de Lewy distintas de la demencia en sí; o

c) características prominentes de la demencia frontotemporal variante conductual; o

d) características prominentes de la afasia primaria progresiva (APP) variante semántica o de la APP variante no fluente o agramática; o

e) evidencia de otra enfermedad neurológica activa concurrente o una enfermedad no neurológica concomitante o uso de medicación que podría tener una repercusión sustancial en la cognición.

**B.- Demencia por EA probable con un nivel de certeza incrementado:**

1. Demencia por EA probable con declive documentado.
2. Demencia por EA probable en un portador de una mutación genética causal de EA (en los genes de la proteína precursora de amiloide *APP*, de las presenilinas 1 *PSEN1* o 2 *PSEN2*).

**C.- La demencia por EA posible se diagnostica cuando el paciente cumple uno de los dos criterios siguientes:**

1. *Evolución atípica*: cumple los criterios clínicos centrales (1) y (4) para la demencia por EA probable, pero tiene un comienzo súbito del deterioro cognitivo o muestra un detalle histórico insuficiente o no está suficientemente documentado un declive progresivo.

**2. Presentación etiológica mixta:** cumple todos los criterios clínicos centrales de (1) a (4) para la demencia por EA probable pero tiene evidencia de:

- a) ECV concomitante, o
- b) características de demencia con cuerpos de Lewy distintas de la demencia en sí, o
- c) evidencia de otra enfermedad neurológica o enfermedad concomitante no neurológica o uso de medicación que pudiera tener una repercusión sustancial sobre la cognición.

#### **D.- Definición de demencia por EA probable con biomarcadores\***

1. Cumple los criterios de (1) a (4) para la demencia por EA probable y tiene los siguientes niveles de probabilidad de fisiopatología de EA sobre la base de perfiles en estudios de neuroimagen y biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (LCR):

- a) Probabilidad máxima: marcador A $\beta$  (LCR o estudios de neuroimagen) positivo y marcador de lesión neuronal (tau en LCR, PET-FDG o RM estructural) positivo.
- b) Probabilidad intermedia: marcador A $\beta$  o marcador de lesión neuronal positivos.
- c) No es informativo: no se dispone de biomarcadores, dan resultados contradictorios o indeterminados.

#### **E.- Definición de demencia por EA posible con biomarcadores\***

1. Cumple los criterios clínicos de demencia por EA posible y tiene los siguientes niveles de probabilidad de fisiopatología de EA sobre la base de perfiles en estudios de neuroimagen y biomarcadores en LCR:

- a) Alta, pero no descarta una segunda etiología: marcador A $\beta$  positivo y marcador de lesión neuronal positivo.
- b) No es informativo: cualquier otra configuración de biomarcadores.

#### **F.- Demencia por EA fisiopatológicamente probada**

Cumple los criterios clínicos de demencia de la EA y el examen neuropatológico demuestra la presencia de patología de EA utilizando criterios ampliamente aceptados.

#### **G.- Demencia improbablemente debida a EA**

- 1. No cumple los criterios clínicos de demencia por EA.
- 2. Cumple los criterios clínicos de demencia por EA posible o probable, pero existe suficiente evidencia para un diagnóstico alternativo, pej, como la demencia del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) o la demencia de la enfermedad de Huntington.
- 3. Cumple los criterios de demencia por EA posible, pero los biomarcadores son negativos.

\***Los biomarcadores de EA**, según el parámetro biológico que miden, pueden dividirse en:

**1) Marcadores de amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ):**  $A\beta_{42}$  baja en LCR o estudios por imágenes PET.

**2) Marcadores de lesión neuronal:** proteína tau ( $\tau$ ) elevada en LCR (proteína  $\tau$  total y/o fosforilada); captación disminuida de fluorodesoxiglucosa en el córtex temporoparietal en PET; o atrofia temporo-parietal desproporcionada en RM.

Sin embargo, no se aconseja el uso de estos biomarcadores de forma rutinaria porque:

**a)** los criterios clínicos centrales aportan una precisión diagnóstica y una utilidad muy buenas en la mayoría de los pacientes;

**b)** se necesita más investigación para asegurar que el uso de los biomarcadores que aquí se ha descrito se ha diseñado apropiadamente;

**c)** existen limitaciones en la estandarización de los biomarcadores de unos lugares a otros; y

**d)** el acceso a los biomarcadores es limitado.

En más del 90% de los casos la EA es una enfermedad esporádica y de inicio habitualmente tardío. Sin embargo existen formas familiares que se caracterizan por tener una herencia autosómica dominante con penetrancia casi completa y ser de inicio precoz. Existen casos de herencia familiar pero de inicio tardío cuyas bases genéticas actualmente son inciertas.

## 1.4.1 EA FAMILIAR

Se han identificado 3 genes (presenilina 1 o *PSEN1*, presenilina 2 o *PSEN2* y proteína precursora de amiloide o *APP*) cuyas mutaciones se relacionan con la EA familiar.

### 1.4.1.1 EA FAMILIAR POR MUTACIÓN EN PRESENILINA 1 (14q.24.3) Y PRESENILINA 2 (1q42.1)

Las mutaciones en los genes de la Presenilina 1 (*PSEN1*) y Presenilina 2 (*PSEN2*) representan el 18-50% y <5% de los casos de EA familiar de inicio temprano, respectivamente.

Las presenilinas constituyen un cofactor de la  $\gamma$ -secretasa, necesario para la síntesis de los péptidos  $A\beta$ . Las mutaciones en estos loci alteran el procesamiento  $A\beta$ , incrementando la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  y favoreciendo el depósito de péptidos  $A\beta$ . (21)

Se han descrito más de 200 mutaciones de *PSEN1* en familias con diferentes orígenes étnicos y al menos 15 para el gen de la *PSEN2*.

Las mutaciones en el *PSEN1* presentan formas más severas y tempranas con gran variabilidad clínica y patológica. La edad de inicio oscila entre los 25 y 65 años y el curso de la enfermedad no parece estar influido por un determinado genotipo APOE. La penetrancia es prácticamente

completa a los 60 años. Son frecuentes las crisis epilépticas y los síntomas extrapiramidales. (22)

Las mutaciones en el *PSEN2* se caracterizan por tener un comienzo más tardío y un curso más largo de la enfermedad. La edad de inicio es en torno a la quinta década y se han descrito familias con penetrancia incompleta. (22)

## 1.4.1.2 EA FAMILIAR POR MUTACIÓN DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DE AMILOIDE (21q.21.3-q22.05)

Las mutaciones en el gen de la *APP* suponen cerca de un 10% de los casos de EA familiar de inicio temprano.

El mecanismo patogénico parece radicar en un depósito anómalo de A $\beta$ . Las mutaciones de *APP* en la región N-terminal generan una mayor cantidad total de A $\beta$  mientras, que las mutaciones en el C-terminal dan lugar a una mayor cantidad de péptido A $\beta$ 42, el cual tiene una mayor tendencia a agregarse y acumularse en placas amiloides. (23)

Se han descrito al menos 32 mutaciones de la *APP*, y mutaciones en el mismo gen se han relacionado con EA presenil y hemorragias cerebrales, o con un tipo de angiopatía amiloidea hemorrágica familiar. La edad de inicio oscila entre los 45 y 65 años de edad y la penetrancia es completa a los 60 años. (24)

Dado que la mutación de la *APP* se produce en el cromosoma 21 se ha relacionado la EA con el Síndrome de Down. Esta relación se atribuye a que el tener una copia extra del gen *APP* en el cromosoma 21 predispone a una excesiva producción de amiloide. Éste se deposita en las placas y también en los vasos, y puede dar lugar en algunos casos a hemorragias lobares. (1)

## **1.4.2 EA ESPORÁDICA**

Más del 90% de los casos de EA parecen ser esporádicos y de inicio tardío. Se cree que una combinación de factores genéticos, epigenéticos, ambientales y el propio envejecimiento son los responsables de la EA.

La apoproteína E4 (APOE  $\epsilon$ 4) es el único factor genético claramente relacionado con el desarrollo de EA esporádica hasta la fecha. El gen que codifica la APOE se localiza en el cromosoma 19q13 y codifica la síntesis de una proteína de 299 aminoácidos con tres variantes polimórficas o alelos:  $\epsilon$ 2 (cisteína en los codones 112 y 158),  $\epsilon$ 3 (cisteína en el codón 112) y  $\epsilon$ 4 (arginina en el codón 112). (1)

La APOE influye en la producción, distribución y aclaramiento del péptido A $\beta$ . Por otro lado; otros estudios sugieren que también podría tener influencia sobre la proteína tau, a la cual se puede unir. Así, las isoformas  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 3$  serían más eficientes que la  $\epsilon 4$  para proteger y secuestrar las proteínas asociadas a los microtúbulos e impedir que la proteína tau se una a sí misma, se hiperfosforilice y forme los filamentos de la degeneración neurofibrilar. También se ha sugerido que la APOE esté implicada en los procesos de plasticidad sináptica, y que el alelo  $\epsilon 4$  es menos eficiente en este papel. (1)

En los pacientes con EA, la frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  se incrementa hasta el 40%; además, hay una relación dependiente de la dosis, de tal manera que las personas homocigotas  $\epsilon 4/\epsilon 4$  tienen un comienzo de la enfermedad más precoz que los heterocigotos.

La asociación de APOE  $\epsilon 4$  y EA también se ha descrito en formas de inicio precoz familiares; así como ya hemos comentado, los pacientes con mutaciones del gen *APP* si además son homocigotos para APOE  $\epsilon 4$  tienen riesgo de inicio más temprano de la enfermedad. (1)

En los últimos años se han prodigado los GWAS, donde se han caracterizado genes como *CLU* en el cromosoma 8, que codifica la clusterina, una proteína que tiene una actividad protectora cerebral (también conocida como *APOJ*); el gen *CRI* localizado en el cromosoma 1, que pertenece al grupo de los receptores de activación del complemento, probablemente implicado en el aclaramiento de A $\beta$ ; y el gen *PICALM* en el cromosoma 11, que podría desempeñar un papel en la conectividad sináptica y modificar la cantidad de depósito A $\beta$  en el cerebro. Otros genes relacionados con la patogenia de la EA han sido genes relacionados con el procesamiento de la *APP* (*NCST*, *APH1*, *PEN2*, *ADAM 10*, *NEP*), relacionados con mecanismos de endocitosis (*BIN1*, *SORL1*, *CD2AP*, *EPHA1*, *CD33*) con la respuesta inmunológica (*TREM2*, *ABCA7*) y fosforilación de la proteína tau (variante p.A152T del gen *MAPT*, *GSK3 $\beta$* , *CDK5*, *TTBK1*). (25)

Una innovación ha sido el estudio en biología de la red o “*network biology*” que se basa en la premisa de que las enfermedades complejas, como las enfermedades neurodegenerativas, son frecuentemente causadas por alteraciones en muchos genes que abarcan múltiples vías biológicas. Así, el análisis de la red combinatoria de los datos proteómicos y transcriptómicos en pacientes con EA reveló subredes asociadas con la patogénesis de la EA, incluyendo la regulación negativa de los genes asociados con la vía MAPK / ERK y la regulación positiva de genes asociados a la vía de endocitosis del receptor mediada por clatrina. De este modo, la interrupción de la vía del receptor mediada por clatrina puede conducir a un aumento de los niveles de APP, contribuyendo así a la progresión de la enfermedad. (26)

La integración de los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), el análisis de ligamiento y el perfil de expresión en una red de interacción proteína-proteína (PPI) produjo 108 factores de riesgo potenciales para EA incluyendo *EGFR*, *ACTB*, *CDC2*, *IRAK1*, *APOE*, *ABCA1* y *AMPH*. (26)

## **2. POLIMORFISMOS DE GENES REPARADORES DEL DNA, AUTOFAGIA, APOPTOSIS Y PROTEÍNA PRIÓNICA**

### **2.1 GENES REPARADORES DEL DNA**

Las células se encuentran constantemente expuestas a multitud de agresiones, tanto endógenas como ambientales, que pueden producir daños en el DNA. Por esta razón, las células poseen diversos mecanismos reparadores que evitan la acumulación de mutaciones y facilitan el mantenimiento de la integridad genómica.

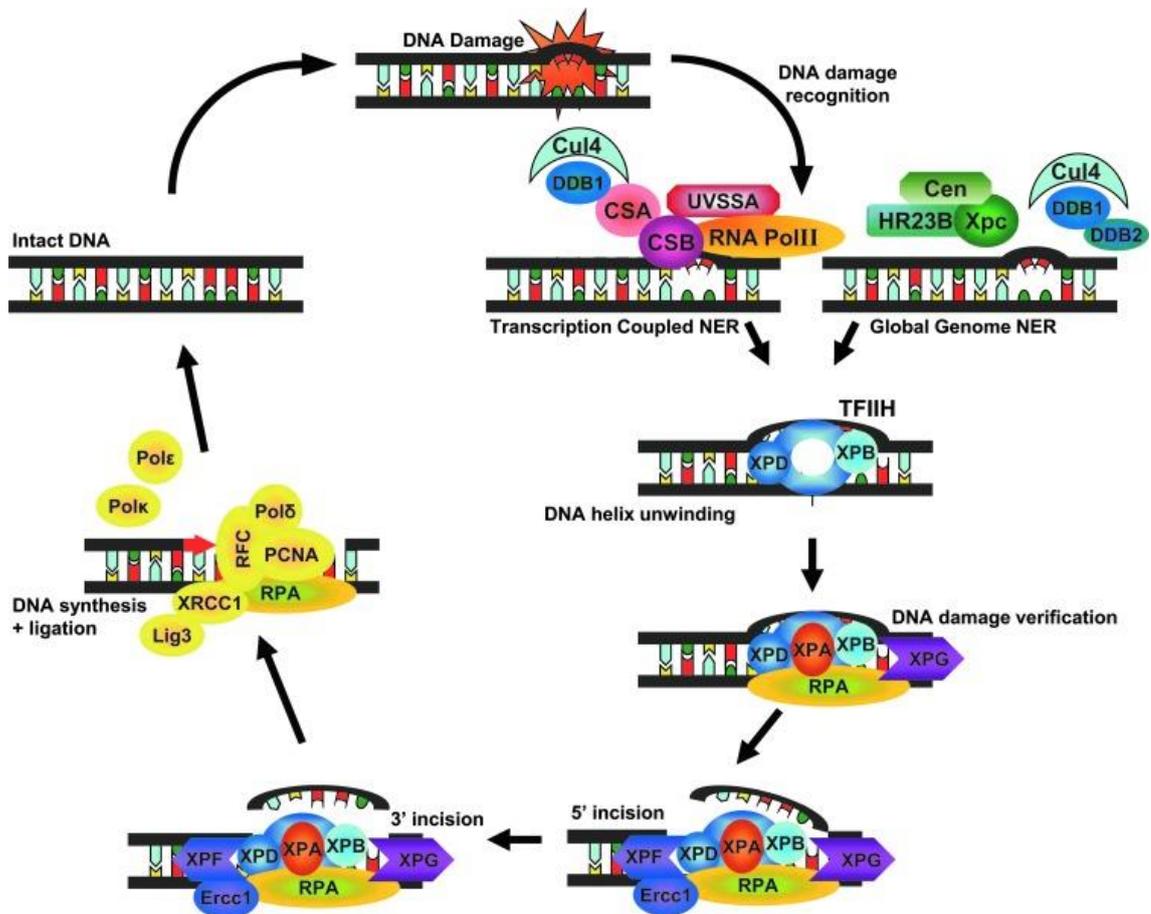
Las cuatro vías fundamentales para la reparación del daño en el DNA son: la reparación por escisión de nucleótidos, la reparación por escisión de bases, la reparación de roturas de doble cadena y la reparación de emparejamientos erróneos. (27) Diversos polimorfismos de genes reparadores, como *XRCC1*, *ERCC2* y *XRCC3*, se han relacionado con una mayor susceptibilidad para el desarrollo de varios tipos de tumores. (28,29)

Por otra parte, se ha postulado que alguno de estos polimorfismos podría asociarse a un aumento del riesgo de desarrollar EA. Los hallazgos anatomopatológicos fundamentales de la EA, como ya se ha comentado, son las placas de  $\beta$ -amiloide y los ovillos neurofibrilares, que contienen proteína Tau hiperfosforilada y DNA fragmentado. El DNA fragmentado estaría formado por DNA no reparado, y la acumulación de éste a lo largo de los años parece estar relacionada con la formación de los ovillos neurofibrilares. (30) Estos procesos se han demostrado en múltiples estudios, en los que se ha objetivado la presencia de DNA dañado en los linfocitos, así como en el LCR de pacientes con EA. Además, recientemente se determinó que algunas neuronas de los pacientes con EA presentaban una disminución de los mecanismos de reparación. En consecuencia, el acúmulo de DNA no reparado y la incapacidad para poder reparar estos daños podrían contribuir a la pérdida neuronal típica de la EA.

## 2.1.1 REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS:

El mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER, *Nucleotide Excision Repair*) elimina los daños generados por hidrocarburos aromáticos policíclicos y la radiación ultravioleta (como los dímeros de pirimidinas, los fotoproductos 6-4 o las uniones intracadena) que generan lesiones voluminosas que distorsionan la doble hélice del DNA. (31)

Existen dos mecanismos de reparación de NER, uno general denominado GG-NER que reconoce y repara lesiones en cualquier punto del genoma a través del complejo XPC–HHR23B, y otro asociado a la transcripción denominado TC-NER; que actúa reconociendo daños que bloquean la actividad de la RNA polimerasa II en sitios transcripcionales activos. Éste último mecanismo se pone en marcha gracias a las proteínas CSA y CSB, cuya función es crítica en este paso. (32,33)(Figura 3)



**Figura 3:** Mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos (33)

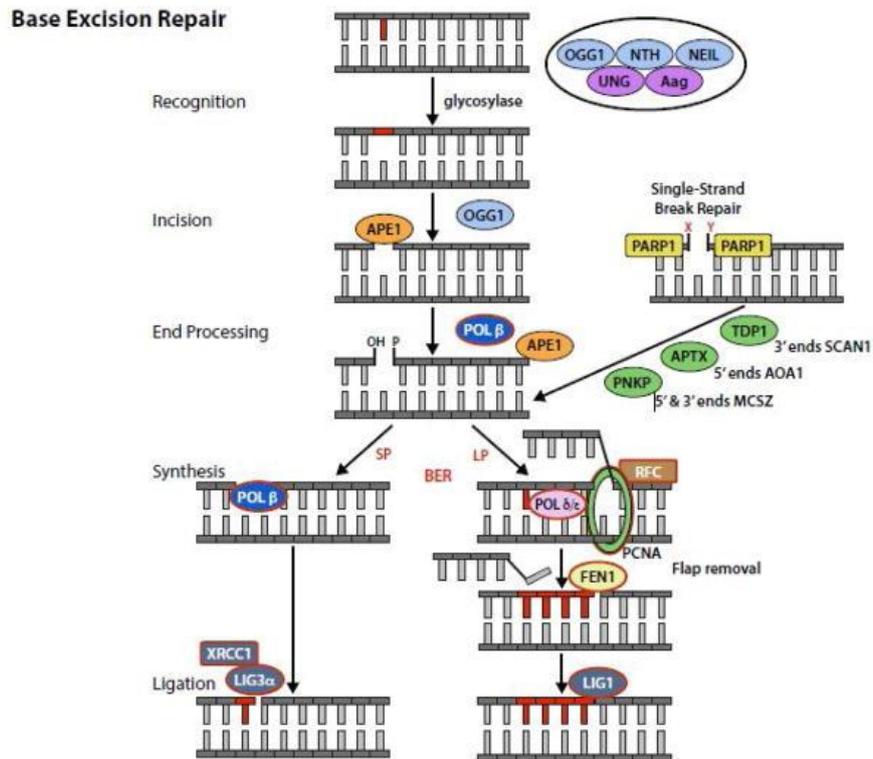
Una vez reconocida la lesión, los pasos que siguen son iguales para ambas vías: desenrollamiento de la doble hélice mediante el complejo TFHII que contiene proteínas con función de helicasa (entre ellas ERCC2 o el también llamado XPD). Secuencialmente, las endonucleasas realizarán dos incisiones a ambos lados de la lesión. Las incisiones en el sentido 3' son llevadas a cabo por XPG, mientras que en sentido 5' la llevará cabo el complejo XPA-RPA-XRCC1. Durante este proceso el fragmento original ha estado protegido por RPA, que además favorece la atracción de PCNA que será la encargada de reclutar los diferentes componentes que facilitarán la formación del nuevo fragmento. Por último, la DNA ligasa 1 une el nuevo fragmento a la secuencia original. (32,33)

### 2.1.2 REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES:

El mecanismo de reparación por escisión de bases (BER, *base excision repair*) se encarga principalmente de reparar los daños generados por especies reactivas de oxígeno así como los producidos por desaminaciones espontáneas o agentes alquilantes mediante la eliminación de la base modificada. El reconocimiento y la escisión de la base alterada se lleva a cabo por una DNA glucosilasa que cataliza la hidrólisis del enlace N-glucosídico generando un sitio abásico (AP, apurínico ó apirimidínico). (34) Existe una vía corta (SP-BER, *short-patch BER*) y una vía larga (LP-BER, *longpatch BER*) de reparación del hueco.

La vía corta es la más frecuente y en ella interviene la DNA polimerasa  $\beta$ , la cual posee dos dominios que le confieren funciones diferentes: un dominio terminal NH2 con actividad AP liasa y que sustrae el residuo azúcar-fosfato abásico y otro dominio polimerasa como tal, que añade el nucleótido correcto. En este proceso interactúa el complejo formado por XRCC1 y DNA ligasa III (LIGI III), actuando XRCC1 como proteína estabilizador permitiendo la unión de la polimerasa y la ligasa al sitio de reparación, al tiempo que se une al DNA por su región amino-terminal.

La vía alternativa larga de reparación se produce cuando el residuo terminal generado es complejo y por lo tanto resistente a la actividad liasa de la polimerasa  $\beta$ . En este caso, la exonucleasa FEN I se encarga de sustraer el fragmento erróneo y la polimerasa  $\delta$  se encarga de rellenarlo con el nucleótido correcto. La estabilización del proceso se llevará cabo en este caso por PCNA. Por último intervendría la DNA ligasa I (LIGI). (35,36)(Figura 4)



**Figura 4:** Mecanismos de reparación por escisión de bases (37)

Este mecanismo actúa a lo largo del todo el genoma, y en ocasiones puede llegar a producir bloqueos en la transcripción. Cuando eso ocurre se pone en marcha el mecanismo NER-TC que se explica en el apartado anterior.

### 2.1.3 REPARACIÓN DE ROTURAS DE DOBLE CADENA:

Las roturas de doble cadena son una de las lesiones más tóxicas y mutagénicas ya que producen una alta inestabilidad genética debido a la pérdida o amplificación de material cromosómico o a la formación de traslocaciones cromosómicas. Estas lesiones se generan principalmente por radiaciones ionizantes, aunque compuestos genotóxicos, especies reactivas de oxígeno generadas en el metabolismo celular o errores en los procesos de replicación, reparación de daños o en la recombinación meiótica pueden también producir este tipo de lesión. (38)

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Existen dos mecanismos de reparación de roturas de doble cadena (DSBR, *double-strand break repair*): la recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*) y la recombinación no homóloga (NHEJ, *non-homologous end joining*). (38) (Figura 5)

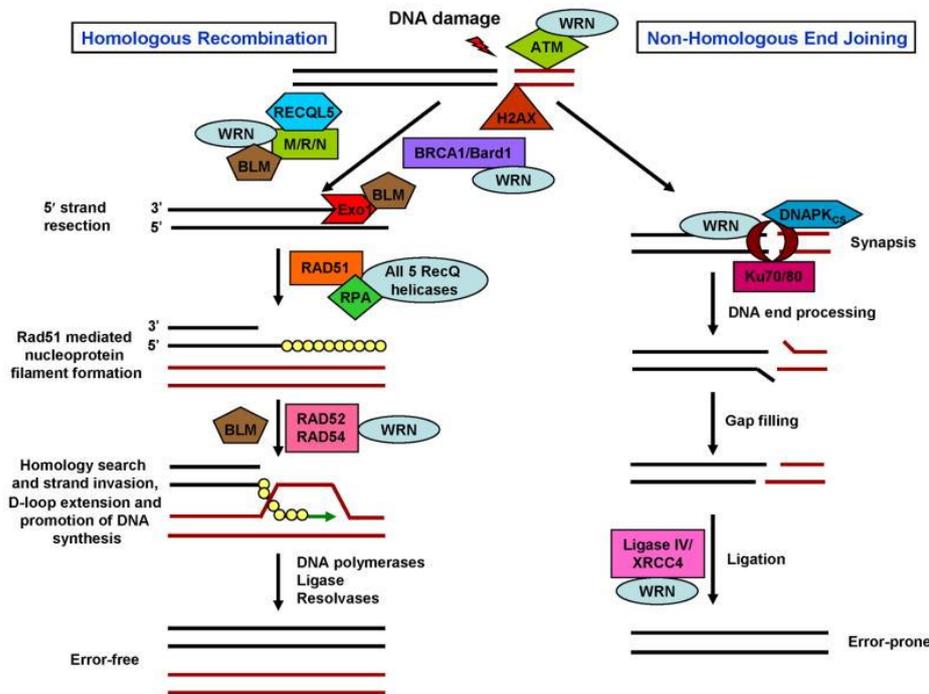


Figura 5: Mecanismo de reparación de roturas de doble cadena (39)

- **Recombinación homóloga (HR):**

Para llevar a cabo esta vía es necesaria una secuencia de DNA homóloga como molde (habitualmente la cromátida hermana), por lo que este proceso sólo puede llevarse a cabo en la fase S o G2 del ciclo celular. Se trata, por lo tanto de un intercambio de información entre regiones homólogas. Si el intercambio es recíproco se le denominará *crossover*, mientras que si no es recíproco se denominará *non crossover*. Este proceso se encuentra regulado por múltiples proteínas entre las que se encuentran ERCC2 y XRCC3.

- **Recombinación no homóloga (NHEJ):**

Para llevar a cabo esta vía no es necesario una secuencia molde DNA homóloga, ya que los fragmentos son procesados de modo y manera y que puedan ser emparejados con secuencias no homólogas. Dicho proceso puede llevarse a cabo en todas las etapas del

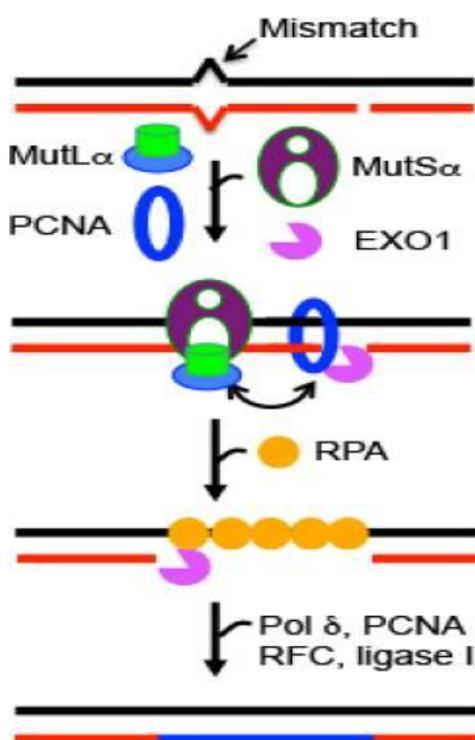
ciclo celular, aunque se produce con mayor frecuencia en la fase G1. Este mecanismo es más rápido, pero también produce mayor cantidad de errores.

El tipo de mecanismo que actuará dependerá de la fase del ciclo celular, del tipo de daño que origine la rotura y de los niveles celulares de los componentes de cada ruta, aunque ambas vías pueden cooperar y funcionar simultáneamente. (38)

## 2.1.4 REPARACIÓN DE EMPAREJAMIENTOS ERRÓNEOS

La principal función del sistema de reparación de emparejamientos erróneos (MMR, *mismatch repair*) es el mantenimiento de la integridad genética mediante la corrección de los emparejamientos erróneos y los bucles provocados por pequeñas inserciones o deleciones generadas durante el proceso de replicación del DNA. El sistema MMR también participa en la reparación de daños provocados por agentes genotóxicos alquilantes, y en la parada del ciclo celular y/o apoptosis en respuesta a ciertos tipos de daño. (40, 41,42) (Figura 6)

En este sistema de reparación intervienen múltiples genes. En primer lugar, el complejo hMutS reconoce los pequeños bucles generados por la inserción, deleción e incorporación errónea de bases y nucleótidos durante la replicación. A continuación, interactúan varias polimerasas. El proceso finaliza a través de DNA ligasas.



**Figura 6:** Mecanismos de reparación de emparejamientos erróneos (41)

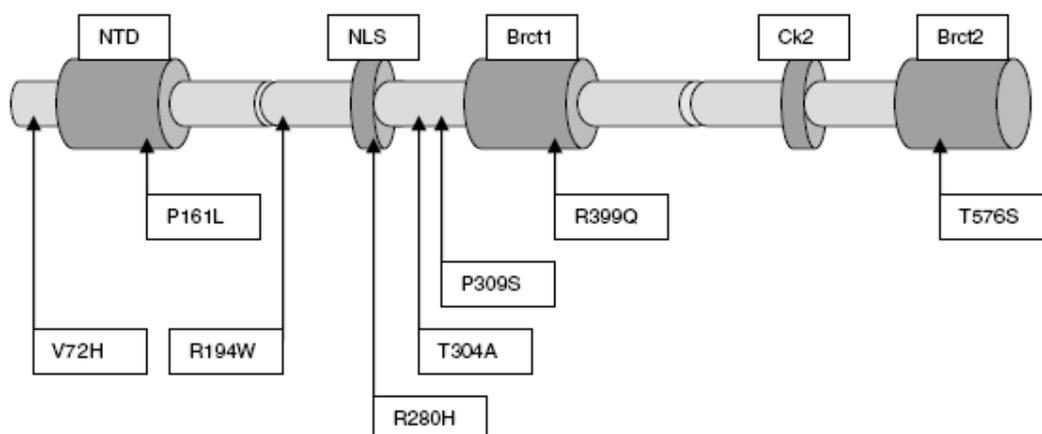
## 2.2 POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON GENES REPARADORES DE DNA

A continuación pasaremos a describir distintos polimorfismos de genes reparadores que intervienen en los diferentes mecanismos de reparación y que se han empleado para la realización de este trabajo.

### 2.2.1 XRCC1 Arg399Gln (rs25487)

El gen *XRCC1* (*X-ray repair cross complementation group 1*), se localiza en el cromosoma 19q13.2-13.3 Codifica una proteína de 70kDa a la que no se ha atribuido actividad enzimática, pero que posee Thrs dominios de interacción con otras proteínas, además de una señal de localización nuclear y un sitio de fosforilación por Ck2. (Figura 7) (43)

*XRCC1* tiene un papel fundamental en la reparación del DNA por Escisión de Bases (BER). Interactúa con múltiples glicosilasas y forma complejos con la mayoría de las proteínas que intervienen en este proceso, como APE1, POL  $\beta$ , PARP1 y DNA ligasa 3 $\alpha$ , lo que sugiere que es reclutado al lugar de la lesión por las glicosilasas y después coordina los siguientes pasos de BER, modulando la actividad del resto de factores implicados. (44)



**Figura 7:** Dominios del gen *XRCC1* (parte superior) y localización de los polimorfismos no sinónimos identificados (43)

Se han descrito más de 60 polimorfismos en este gen, de los que el más estudiado es Arg399Gln, localizado en el exón 10, en el dominio BRCT-1. Consiste en el cambio de Guanina (G) por Adenosina (A) en la secuencia del DNA, lo que una vez transcrito supone la sustitución

de Arginina (Arg) por Glutamina (Gln) en la región BRCT-1. De acuerdo con los diferentes estudios, la variante Gln399 está presente en el 23-36% de la población general, y se ha demostrado que la presencia del alelo variante de Gln399 se asocia con una capacidad de reparación de DNA reducida. Se han realizado una gran cantidad de estudios epidemiológicos moleculares para evaluar el papel del polimorfismo Arg399Gln en el riesgo de cáncer; sin embargo, los resultados siguen siendo contradictorios en lugar de concluyentes. (45)

Otro SNP conocido es Arg194Trp localizado en el exón 6. Consiste en un cambio de Citosina (C) por Timina (T) en la secuencia de DNA, lo que una vez transcrito supone la sustitución de Arginina (Arg) por Triptófano (Trp) en la posición 194. Esta variante se encuentra en aproximadamente el 9,2% de los europeos. (46)

Un estudio llevado a cabo por Gürdal Orhan y cols. (47) en población turca demostró una asociación estadísticamente significativa entre ser portador del alelo Gln399 del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* y el riesgo de ictus, siendo éste el doble en pacientes con los genotipos Arg/Gln, Gln/Gln y Arg/Gln+Gln/Gln. Este riesgo aumentaba tras el ajuste por edad, sexo e índice de masa corporal. En cambio, dos estudios realizados en población asiática (48,49) sólo encontraron una asociación débil entre este polimorfismo y el riesgo de ictus en población asiática.

Por otra parte, S. Dogru-Abbasoglu y cols. han estudiado la relación del polimorfismo Arg194Trp del gen reparador del DNA *XRCC1* con el riesgo de padecer EA en la población turca. En este estudio la frecuencia del alelo 194Trp era mayor en los casos que en los controles, sin embargo el riesgo estimado no era estadísticamente significativo, revelando una significancia limitada para 194Trp. (30) En otro estudio llevado a cabo por Kwiatkowski y cols. en población caucásica los resultados obtenidos fueron similares con el SNP Arg194Trp. No obstante, al analizar el SNP Arg399Gln determinaron una asociación estadísticamente positiva entre los portadores del genotipo Arg/Gln y el riesgo de desarrollar EA, mientras que el genotipo Gln/Gln reducía el riesgo de EA. (46) No existen estudios de estos polimorfismos para DV.

## 2.2.2 *ERCC2* Lys751Gln (rs13181)

El gen *ERCC2* (*X-ray repair cross complementation Group 2*), o también conocido como gen XPD (*Xeroderma pigmentoso D*), es un gen de 54.3kb localizado en el cromosoma 19q13.32. Codifica una helicasa de 760 aminoácidos, evolutivamente muy conservada, que forma parte de uno de los complejos empleados para la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER). La proteína codificada, es una helicasa dependiente de ATP que abre la hélice de DNA en sentido 5'-3' para que puedan iniciarse los procesos de transcripción y reparación. (50)

Se conocen múltiples SNP del gen *ERCC2*; la mayoría de ellos en regiones intrónicas no codificantes, por lo que se consideran inocuas. (51) De los que se localizan en regiones exónicas el cambio de Adenina (A) por Citosina (C) en la posición 2329, es probablemente el más estudiado, ya que produce un cambio en la secuencia de aminoácidos y por lo tanto un cambio conformacional en la proteína. El cambio de Lisina (Lys) por Glutamina (Gln) en el codón 751 introduce un cambio conformacional en el extremo carboxiterminal de la proteína. En condiciones normales este extremo carboxiterminal se une a p44, proteína responsable de activar la función helicasa de XPD dentro del complejo TFIIH. (52) Si bien esta alteración no elimina por completo la actividad de *ERCC2*, sí la disminuye de manera importante, comprometiendo la reparación del DNA de forma que las células son más sensibles a las lesiones inducidas por exposición a las radiaciones X y ultravioleta. La variante polimórfica Gln751 está presente en aproximadamente el 30-40% de la población general. (53)

Este gen ha sido estudiado ampliamente en relación con la génesis de tumores, encontrándose relación entre el polimorfismo Lys751Gln y el melanoma, cáncer epidermoide de cabeza y cuello, el de mama, con el cáncer de vejiga y con el glioblastoma multiforme. (54,55)

En un estudio llevado a cabo por Shyu y cols. en la población asiática demostró una asociación estadísticamente significativa entre ser portador del alelo Gln751 y el riesgo de ictus de gran vaso de origen aterosclerótico. A su vez, el riesgo se incrementaba 2,73 veces en los pacientes fumadores. Este riesgo se incrementaba 1,56 veces si además el paciente era portador homocigoto (48). Otro estudio realizado por Mahabir y cols. observó que los portadores de los alelos de la variante XPD23 tenían aproximadamente dos veces más riesgo de ictus isquémico que los no portadores. (49)

Recientemente S. Dogru-Abbasoglu y cols. han estudiado en la población turca la relación del polimorfismo Lys751Gln del gen reparador del DNA *ERCC2* con el riesgo de padecer EA sin encontrar resultados estadísticamente significativos; no pudiendo establecer relación entre ser portador de este polimorfismo y el desarrollo de EA. (56) Este polimorfismo no ha sido tan ampliamente estudiado como *XRCC1*, por lo que quizás sean necesarios estudios con un mayor número de pacientes para determinar su relación. No existen estudios para este polimorfismo y DV.

### **2.2.3 *XRCC3* Thr241Met (rs861539)**

El gen *XRCC3* (*X-ray repair cross complementation Group 3*) se localiza en el cromosoma 14q32.3 y juega un papel clave en la reparación de Roturas de Doble Cadena de DNA (DSBR) a través del mecanismo de Recombinación Homóloga ya que coordina el proceso y resolución de la conversión génica. (57)

A pesar de que se han identificado varios polimorfismos en *XRCC3*, Thr241Met es probablemente el más estudiado de ellos, debido a su alta frecuencia en la población general. Se ha descrito la presencia del aleo Met241 con una frecuencia entre el 22 al 44% de la población. (58)

La sustitución de Citosina (C) por Timina (T) en la posición 18067 (exón 7) del gen *XRCC3* se traduce en el cambio de Treonina (Thr) por Metionina (Met) en el codón 241. Este cambio elimina un sitio de fosforilación de la proteína, impidiendo la interacción de *XRCC3* con otros elementos de la vía DSB y alterando la capacidad de reparación celular. (59)

Se han llevado a cabo múltiples estudios moleculares y epidemiológicos para evaluar el papel de esta variante en diferentes tipos tumorales, así como en la sensibilidad y respuesta a diferentes fármacos, principalmente, agentes alquilantes. (60,61)

Sin embargo, a pesar de conocerse la influencia de las vías de genes reparadores de DNA en el desarrollo de EA, todavía no se han llevado a cabo estudios que relacionen al polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* y la EA. Este polimorfismo tampoco ha sido estudiado en relación con la DV.

## 2.3 POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN *TP53* (rs1042522)

La proteína Tp53 fue descrita por primera vez en 1979 por tres equipos liderados por A. Levine, P. May y L. Old. Se trata de una proteína que está altamente conservada en todas las especies animales. Es sintetizada por el gen *TP53*, que se localiza en el cromosoma 17p13 y contiene 39 codones distribuidos en 11 exones que ocupan cerca de 20 kb en el brazo corto del cromosoma 17. (62)

La Tp53 es una proteína constituida por 393 aminoácidos (AA), y participa como reguladora en múltiples mecanismos celulares. (Figura 8) La región N-terminal contiene los dominios para la transactivación (AA 1-62). Éste se continúa de la región rica en prolina (residuos del 63-97) los cuales tienen un papel en la apoptosis. El dominio central (el dominio core, AA 102-292) contiene dominios de unión al DNA específicos. El extremo C-terminal incluye el dominio de tetramerización (AA325-360) y dominios de autorregulación negativa. Las señales de exportación nuclear (NES) existen en las regiones N- y C- terminales, mientras que las señales de localización nuclear (NLS) sólo existen en la región C-terminal. (62)



**Figura 8:** Estructura de la proteína TP53 (62)

Múltiples estímulos, como por ejemplo las radiaciones ionizantes, los daños en el DNA, el óxido nítrico, hipoxia, agentes quimioterápicos o agentes oncogénicos pueden activar a *TP53*. En respuesta a estos estímulos, *TP53* puede presentar varios cambios y su activación puede producir diferentes efectos. Además, es un factor de transcripción que está involucrado en el control de la transición de la fase G1 a S y G2 a M de la mitosis, en la reparación del DNA, en la apoptosis, autofagia y angiogénesis entre otras. (62) A continuación, se explican brevemente las principales funciones de *TP53*.

## - **REGULA EL CICLO CELULAR:**

Tp53 regula el punto de control de la fase G1 de la mitosis, pudiendo inducir la parada del ciclo celular si las lesiones detectadas en el DNA son extensas. Tp53 además, también estimula la expresión de la proteína 14-3-3 $\sigma$  la cual secuestra al complejo de ciclinas B1/CDK1 para bloquear la transición de la fase G2 a M. Por otro lado también puede inducir la expresión de otras proteínas como GADD45, la cual interactúa con PCNA para inhibir el ciclo celular hacia la fase S entre otras.

## - **SENESCENCIA CELULAR:**

Se cree que la senescencia celular desempeña un papel importante en la supresión tumoral y contribuye al envejecimiento celular. Tp53 parece ser un mediador crítico de la senescencia, participando en la inducción y el mantenimiento de la misma. La activación de Tp53 es un paso esencial en la inducción de la senescencia tras lesiones en el DNA u otras formas de estrés. En el contexto de la senescencia, Tp53 está controlada por ATM / ATR y proteínas Chk1 / Chk2, que causan la estabilización postraduccional de Tp53 a través de su fosforilación.

## - **APOPTOSIS:**

La apoptosis es una de las funciones principales de Tp53. Se ha demostrado que Tp53 puede transactivar los receptores de muerte celular CD95 o TNF que inducen la formación del complejo DISC y finalmente activan la caspasa 8. Tp53 también activa miembros proapoptóticos de la familia Bcl2: Bax, Noxa y Puma implicados en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Además, también se conoce que Tp53 tiene un papel directo en el inicio de la muerte celular localizándose en las mitocondrias y regulando directamente la permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

## - **AUTOFAGIA:**

La autofagia consiste en la degradación lisosómica de componentes intracelulares que conduce a la generación de nuevos sustratos metabólicos, favoreciendo así la adaptación al estrés y la supervivencia celular. Tp53 puede activar pero también inhibir la autofagia.

## - ANGIOGÉNESIS:

La formación de nuevos capilares sanguíneos (angiogénesis) está estrechamente regulada por factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Se ha demostrado que Tp53 limita la angiogénesis mediante una serie de mecanismos: a) interfiere con los reguladores centrales de la hipoxia que median la angiogénesis, b) inhibe la producción de factores proangiogénicos y c) aumenta directamente la producción de inhibidores de la angiogénesis endógenos. La combinación de estos efectos permite a Tp53 bloquear eficazmente el potencial angiogénico de las células cancerosas.

La mayor parte de los SNP estudiados para *TP53* se localizan en regiones intrónicas. Uno de los más caracterizados es Ins16bp localizado en el intrón 3. Este SNP se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer ciertos tumores. (63)

Dentro de las regiones exónicas el único SNP relacionado con la apoptosis validado y sujeto a análisis ha sido el Arg72Pro localizado en el exón 4. (64)

El codón 72 codifica un dominio rico en prolina, esencial para la función de *TP53*, sobre todo para su función apoptótica. En nuestra población, es mucho más frecuente la variante arginina (Arg). Diversos estudios han demostrado que existen diferencias en la función de la proteína dependiendo de la variación génica. De este modo, la producción de Arginina (Arg72) induce 5 veces más la apoptosis que la variante con Prolina (Pro72). (65)

### 2.3.1 *TP53* Y DEMENCIA

Gómez y cols. determinaron la relación entre el genotipo Arg/Arg del polimorfismo Arg72Pro de *TP53* con mal pronóstico funcional tras un ictus isquémico o hemorrágico. Además demostraron en cultivos neuronales que la variante Arg72 posee capacidad para la activación de la vía apoptótica intrínseca, aumentando la vulnerabilidad de la muerte celular apoptótica inducida por isquemia. (65)

Otro estudio llevado a cabo por Martínez Lucas y cols. encontró un peor pronóstico tras traumatismo craneoencefálico en pacientes portadores de la variante Arg/Arg del polimorfismo Arg72Pro de *TP53*. (66)

Es bien conocida que la inactivación de *TP53* está relacionada con la producción de muchos tipos de tumores; sin embargo, parece tener una relación inversa con la EA. Es decir, la sobreactivación de *TP53* induciría una muerte celular masiva en aquellas células con daños

producidos por diferentes agentes, generando un mayor envejecimiento celular y, por lo tanto, predisponiendo a la EA. (67) El acúmulo de estrés celular produce un aumento de la proteína precursora de amiloide (APP), la cual media en parte la expresión de *TP53* -ya que favorece la unión entre los complejos A $\beta$  y el promotor de *TP53*-, aumentando la transcripción de la misma. Además, de forma indirecta, *TP53* favorece la fosforilación de la proteína Tau. En cuanto a la relación de EA esporádica con el polimorfismo Arg72Pro del gen *TP53*, dos estudios no encontraron una asociación entre este polimorfismo y el inicio o la progresión de EA. Un único estudio realizado por Scacchi y cols. demostró relación entre el genotipo Pro/Pro y la EA esporádica. (68) No existen estudios publicados del polimorfismo Arg72Pro de *TP53* en DV.

## 2.4. AUTOFAGIA

La autofagia es un mecanismo de degradación lisosomal muy regulado y conservado evolutivamente. Es una vía empleada para la degradación de macromoléculas y de orgánulos. La disregulación de esta vía, ya sea por inhibición o por sobreexpresión, se ha relacionado con el desarrollo de cáncer y enfermedades neurodegenerativas como la EA o la Enfermedad de Huntington. (69)

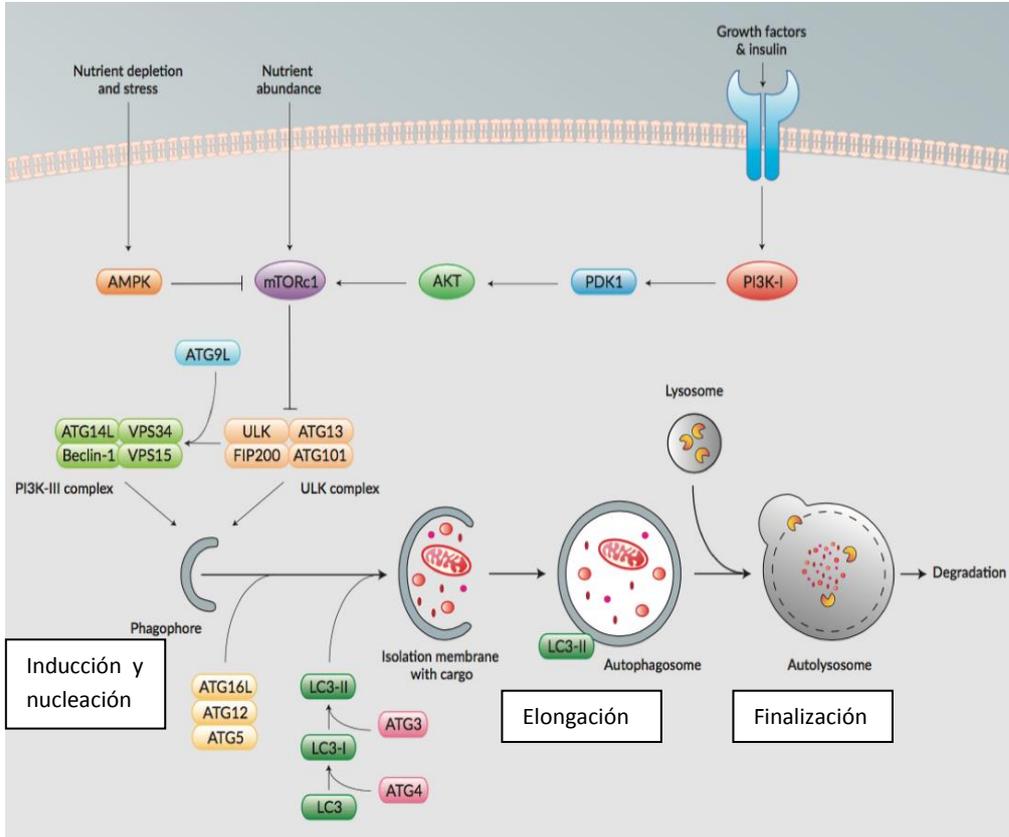
En los organismos eucariotas existen tres tipos de autofagia: (70)

- Autofagia mediada por chaperonas: Permite que se importen al lisosoma proteínas del citoplasma solubles y sin plegar.
- Microautofagia: Por esta vía el material citoplasmático a degradar es digerido directamente por el lisosoma a través de una reestructuración de su membrana.
- Macroautofagia: Es la ruta por la que se forman unas estructuras de doble membrana que engloban el material citoplasmático (autofagosoma), que posteriormente se fusionará con el lisosoma, para dar lugar a una estructura conocida como autofagolisosoma donde se procederá a la degradación del material a través de hidrolasas.

En este trabajo nos centraremos sobre todo en la ruta de la macroautofagia, la cual a partir de ahora pasaremos a llamar autofagia. Este proceso consiste en la formación de una estructura de doble membrana conocida como autofagosoma que posteriormente se fusiona con el lisosoma. Para llevar a cabo este proceso se precisa de la intervención de una serie de macrocomplejos proteicos (*core autophagy machinery*). (70) El conocimiento de la regulación de todos estos procesos comenzó en los años 90 a partir del

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

descubrimiento de los genes *ATG* (*Autophagy Related Genes*) en levaduras. (71) El proceso de autofagia se lleva a cabo en tres fases (Figura 9):



**Figura 9:** Esquema del proceso de autofagia (72- modificado)

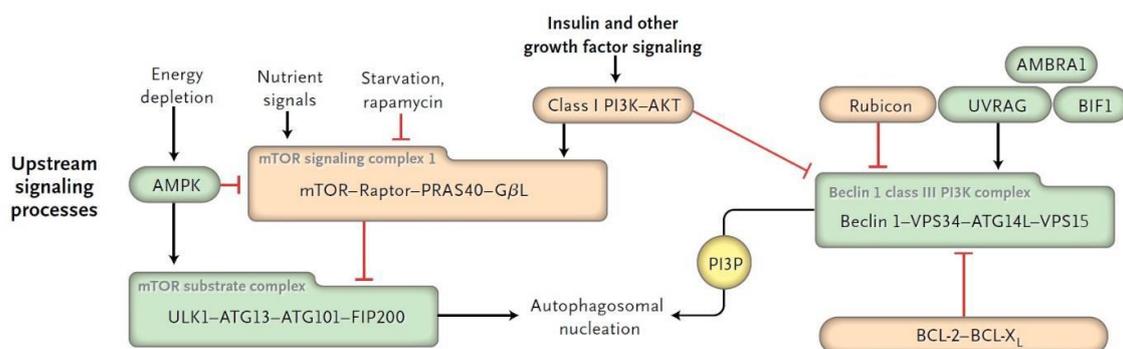
- **Inducción y nucleación:** El principal regulador inicial de esta vía es la serina/treonina quinasa mTor (*mammalian Target of Rapamycin*). mTor es un supresor de la autofagia que controla el crecimiento y proliferación celular. Cuando hay gran cantidad de nutrientes mTor se activa y bloquea la autofagia a través de la fosforilación de ATG13. Sin embargo, ante la ausencia de nutrientes, mTor se inactiva y favorece la fosforilación del complejo ULK1 (formado por Atg13-ULK1-Atg10-FIP200). El complejo ULK1 se trasloca a zonas donde se facilita la formación del autofagosoma y la posterior inducción de la nucleación. (73-74)
- Existen otros reguladores de la inducción como la quinasa AMPK, que ante el estrés energético también fosforila ULK1 e induce la autofagia. Además la AMPK activa inhibe de forma indirecta a mTor. (75)

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Por último, otro regulador de esta vía es Tp53. Cuando Tp53 está activa (bajo estrés genotóxico) induce la transcripción de los genes de las proteínas ULK1, ULK2 y AMPK, y aumenta los niveles de autofagia. En cambio, cuando Tp53 está inactiva inhibe la autofagia al unirse a FIP200, lo que bloquea la formación del complejo ULK-ATG13-ATG10-FIP200. (75)

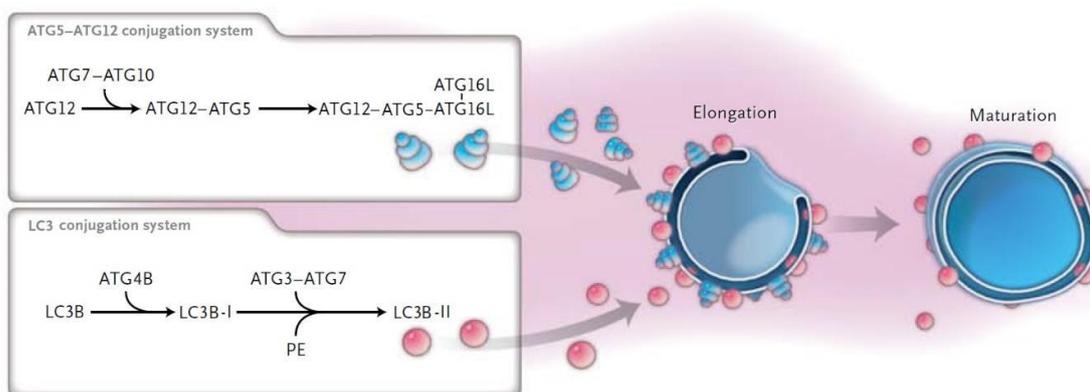
Tras la inducción llevada a cabo por ULK1, tiene lugar la nucleación. La nucleación es un proceso altamente regulado por el complejo PI3KC3 el cual está formado por las proteínas Beclina-1, Vps 15, Vps14 y Atg14. Tanto la inducción como la nucleación tienen como resultado la síntesis de PI(3P) que permite reclutar las proteínas necesarias para la formación posterior del autofagosoma. (76)

El complejo PI3KC3 está regulado en parte por ULK 1, pero también por otro tipo de proteínas. Así, por ejemplo, Bcl-2 puede bloquear a Beclina-1 inhibiendo la autofagia. Por otra parte UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene protein*) cuando se asocia a AMBRA1 promueve la autofagia a través de Beclina-1; sin embargo, cuando UVRAG se une a RUBICON inhibe la autofagia. (77)(Figura 10)



**Figura 10:** Resumen de los procesos que inhiben o activan el proceso de autofagia en la fase de inducción. En rojo, los procesos que lo inhiben, en verde los procesos que la activan. El principal objetivo de esta vía es la síntesis de PI3P que será la encargada de continuar con el proceso de formación del autofagosoma. (75-modificado)

- **Elongación:** La finalidad de este proceso es formar sistemas membranosos capaces de englobar proteínas y orgánulos completos. Para este proceso es imprescindible la participación de dos complejos: ATG12-ATG5-ATG16L1 y LC3. Para la formación de ATG12-ATG5-ATG16L1 se requiere la participación de Atg10. Para la formación de LC3, es preciso que Atg4 procese su forma primaria pro-LC3 a la forma citosólica LC3-I. Una vez en el citosol, LC3-I se conjuga con ATG7 y ATG3 para dar lugar a LC3-II quien finalmente se unirá a la membrana. Este proceso también se ve favorecido gracias a ATG12-ATG5-ATG16L1. Posteriormente ATG12-ATG5-ATG16L1 se disocia tras sellarse el autofagosoma, permaneciendo LC3-II en la membrana que será lo que sirva como marcador de presencia de vesículas de autofagia. (78,79)



**Figura 11:** Resumen de las vías que favorecen la elongación (75- modificado)

- **Finalización:** Por último, los autofagosomas se transportarán hasta zonas ricas en lisosomas gracias a los microtúbulos donde se fusionan con la ayuda de varias proteínas transmembrana para llevar a cabo la degradación del material citoplasmático inicialmente englobados.

La fusión de autofagosoma con el lisosoma puede llevarse a cabo de forma directa o indirecta a través de la formación de un endosoma, dando lugar a un amfisosoma que finalmente se fusionará con el lisosoma. Esta etapa final está mediada por proteínas de la familia SNARE (VAMP3, VAMP7 y VAMP8) implicadas en procesos de fusión de vesículas, las cuales a su vez están reguladas por proteínas PICALM. (80,81)

Para poder llevar a cabo los procesos de degradación, es imprescindible que el pH lisosomal sea el adecuado (el cual está regulado por la Presenilina 1) y que las enzimas de degradación (hidrolasas B,D y L) estén activas. Una vez degradado el material este será devuelto al citosol. (81)

Durante todo este proceso se consumen lisosomas por lo que es preciso que siempre haya un número suficiente de ellos. El factor de transcripción EB (TFEB) ha sido identificado como un regulador clave de la en la biogénesis lisosomal. (79)

## 2.4.1 AUTOFAGIA Y DEMENCIA

La autofagia es un proceso fundamental en todas las células, pero mucho más en las neuronas ya que los agregados proteicos no pueden disolverse a través de la división celular. La alteración de los procesos de degradación como la autofagia produce un depósito anómalo de sustancias en las neuronas que se ha relacionado con múltiples enfermedades neurodegenerativas como la EA, Enfermedad de Parkinson o la Enfermedad de Huntington. (82)

Uno de los primeros indicios que hicieron sospechar que la autofagia estaba alterada en la EA fue la observación de múltiples vesículas de autofagia sin degradar en las neuronas afectadas. Las principales proteínas implicadas en el proceso de autofagia que se han demostrado estar alteradas en la EA son Beclina-1, PSEN-1 y las PICALM. (83)

- **Beclina 1:** Como se ha comentado anteriormente Beclina-1 es una proteína fundamental en las primeras etapas de la autofagia. Cuando ésta no funciona correctamente la carga que se iba a degradar, se acumula en el citosol y favorece la agregación de otros componentes intracelulares como proteínas mal plegadas o tóxicas tales como la beta-amiloide o tau-hiperfosforilada. (83,84,85)
- **PICALM:** Las proteínas PICALM regulan a las proteínas de la familia SNARE (como VAMP7 y VAMP8) que favorecen el tráfico de vesículas por la célula. Cuando PICALM está anormalmente escindido hay una menor fusión de autofagosomas y un menor flujo, con lo que se van acumulando en el citosol. Esta acumulo interfiere con el tráfico intracelular y además se puede convertir en una fuente de productos citotóxicos como la proteína Tau. (84)
- **PSEN-1:** PSEN-1 es fundamental para la regulación del pH del lisosoma para que así se pueda llevar a cabo la degradación. Una alteración de PSEN-1 dificultaría la degradación correcta de la carga, lo que a su vez daría lugar a una acumulación masiva

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

---

de autofagolisosomas. Estos autofagolisosomas se comenzarían a degradar y saldrían al citosol enzimas lisosomales que producirían muerte celular. (84,86)

En los tres procesos, el resultado final es la acumulación de diferentes materiales en el citosol, que producen finalmente agregados que poco a poco se van convirtiendo en lo que conocemos como placas seniles (por agregación de A $\beta$ ) y ovillos neurofibrilares (por agregación de Tau hiperfosforilada) característicos de la EA. (85,86)

Por ello, se cree que las terapias con agentes inductores de la autofagia podrían mostrarse eficaces en fases leves de la EA, ya que evitarían el depósito de beta-amiloide y proteína tau. Sin embargo, en fases avanzadas de la EA, donde ya existe un gran depósito de sustancias tóxicas, sería mejor el empleo de terapias que favorecieran la fusión del autofagosoma con el lisosoma o que aumentaran la actividad lisosomal. (87)

La inhibición del complejo mTOR ha sido durante mucho tiempo el principal objeto de estudio en el campo de la regulación autofágica como estrategia terapéutica en neurodegeneración, ya que se ha observado en algunas ocasiones que la autofagia sólo se da de forma basal por inhibición constante de mTOR. (87) El primer fármaco que se identificó como inductor de la autofagia por inhibición de mTOR fue la Rapamicina. En varios modelos animales se ha observado que la Rapamicina disminuye los niveles cerebrales de péptido A $\beta$  y de proteína Tau hiperfosforilada. En esta línea, también ha sido estudiada una molécula inductora de Rapamicina denominada SMER28. (87,88) Otra molécula en investigación es Latrepirdine, que estimula la autofagia y, por lo tanto, reduce el depósito de A $\beta$ . Actualmente, este ensayo clínico se encuentra en fase III. Por último, también se ha estudiado la Metformina por su capacidad para inhibir a mTOR; esta estrategia se encuentra en fase II de ensayo clínico. (89)

A pesar de los buenos resultados, muchos estudios no se están pudiendo llevar adelante por la presencia de efectos secundarios atribuibles a la implicación de mTOR en otros procesos celulares, además de la autofagia.

Como se comentó anteriormente, el complejo inicial ULK1 también puede ser regulado por AMPK. Varios estudios recientes han postulado al Litio como fármaco capaz de inducir autofagia a través de AMPK. En diversos modelos animales se ha mostrado como

neuroprotector, y estudios recientes en humanos han evidenciado que la toma diaria de 1 comprimido de Litio puede retrasar el inicio de la enfermedad. (90)

El Resveratrol también ha demostrado papel neuroprotector gracias a la activación de AMPK. (91)

Por último, se han estudiado estrategias que actúan en la fase final del proceso de autofagia, es decir, estrategias que favorecen la actividad lisosomal. Como ya se comentó anteriormente, el TFEB está implicado en la biosíntesis lisosomal. Un estudio llevado a cabo en ratones ha sido capaz de estimular la autofagia a través de la sobreexpresión exógena de TFEB, reduciendo el número de placas seniles y disminuyendo la actividad de la proteína Tau. (92)

Otro compuesto que se ha relacionado con la actividad lisosomal ha sido la vitamina hidrosoluble Niacina. El uso de la Niacina se está estudiando en un modelo de ratón que busca prevenir la patología a través de la acidificación de los autofagosomas, lo cual reduciría la acumulación de autofagosomas y favorecería la correcta degradación de la carga. Este estudio se encuentra actualmente en fase I. (93)

Por otro lado, se conoce la implicación de la autofagia en los mecanismos de isquemia cerebral. No obstante, existe controversia sobre si la activación de la autofagia es una manifestación de un mecanismo neuroprotector o, por el contrario, contribuye a una mayor muerte celular. La teoría dominante es que la autofagia actuaría como un mecanismo de protección si se activa de forma temprana como respuesta a factores apoptogénicos. De hecho, se cree que las vías de señalización asociadas con la autofagia podrían representar un objetivo potencial de nuevas estrategias neuroprotectoras. (94)

En resumen, el conocimiento de estos procesos llevó a valorar la autofagia como posible vía para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Sin embargo, esta vía se ha visto limitada por la comprensión incompleta de los mecanismos de autofagia, la escasez de compuestos o moléculas que influyan en misma y la disponibilidad limitada de terapias candidatas con eficacia clínica. (94)

## 2.5 POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA

### 2.5.1 *ATG2B* Gln1383Glu (rs3759601)

En los humanos existen dos variantes homólogas de *ATG2*: *ATG2A* y *ATG2B* similares entre sí. Ambas resultan esenciales en la formación del autofagosoma así como en la regulación del tamaño y distribución de los remanentes lipídicos.

El polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B*, situado en la posición 9631131 del cromosoma 14, traduce una translocación de citosina (C) por guanina (G) en el primer nucleótido del codón 1383, que provoca un cambio de glutamina (Gln) por ácido glutámico (Glu). (95)

### 2.5.2 *ATG16L1* Thr300Ala (rs2241880)

El gen *ATG16L1* codifica una proteína que forma parte de un complejo proteico relacionado con *ATG5* y *ATG7*. El reclutamiento ineficaz de dichos genes como resultado de la variación de *ATG16L1* se traduce en un deterioro generalizado de las funciones de autofagia.

El polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1*, situado en la posición 233274722 del cromosoma 2, consiste en una translocación de Tiamina (T) por Citosina (C) en el primer nucleótido del codón 300 que provoca un cambio de aminoácido de Treonina (Thr) por Alanina (Ala). La prevalencia de este SNP es relativamente frecuente en la población general, habiéndose descrito hasta en el 51,3% de los casos en algunos de los grupos de investigación. (96)

### 2.5.3. *ATG10* Thr212Met (rs1864483)

*ATG10* es una enzima que interacciona con *ATG7* permitiendo posteriormente la conjugación de *ATG5* con *Atg12* para formar finalmente el complejo *ATG12-ATG5-ATG16L*.

El polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10*, situado en posición 82253397 del cromosoma 5, consiste en una transición de citosina (C) por tiamina (T) en el segundo nucleótido del codón 212 que produce un cambio de Treonina (Thr) por Meteonina (Met).(97)

### 2.5.4 POLIMORMISMO INTRÓNICO g.10621860 C>G DE *ATG5* (rs2245214)

La proteína *ATG5* forma parte del complejo *Atg12-Atg5-Atg16L* necesario para la formación de autofagosoma.

El polimorfismo rs2245214, Situado en la posición 10621866 dentro del cromosoma 6, produce una traslocación de citosina (C) por guanina (G) que da lugar a un polimorfismo intrónico. (98)

## **2.6 POLIMORFISMO Met129Val DEL GEN *PrNP* (rs 1799990)**

El gen que codifica la proteína priónica humana (*PrNP*) se localiza en la región cromosómica 20p12.3 y consta de 2 exones constituidos por 134 y 2355 pares de bases cada uno de ellos. Este gen codifica una proteína de 253 aminoácidos altamente conservada en los mamíferos. (99)

A pesar de tratarse de una proteína muy conservada, se han descrito varios polimorfismos en la población humana, con frecuencia variable y en diferentes poblaciones. De entre todos los polimorfismos, el más frecuente es el Met129Val (produce un cambio en codón 129 de metionina por valina). Este polimorfismo es el que presenta un efecto más claro tanto en la susceptibilidad, como en las variaciones fenotípicas de las enfermedades priónicas. (99)

El gen *PrNP* es responsable de las enfermedades conocidas como enfermedades priónicas, que se producen por el acúmulo de proteína priónica (PrPC) en diferentes localizaciones del SNC; dando lugar a enfermedades como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el insomnio familiar fatal, la enfermedad de Gerstmann-Straussler o el kuru. Estas enfermedades son en su mayoría, esporádicas, pero un pequeño porcentaje pueden ser secundarias a mutaciones heredadas del gen *PrNP*. Así, por ejemplo, todos los casos hereditarios de Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob reportados hasta la fecha eran homocigotos para el alelo 129Met del polimorfismo Met129Val. Se ha visto que este polimorfismo modifica aspectos básicos del fenotipo de la enfermedad cuando se encuentra localizado en un alelo mutante, mientras que en un alelo normal influencia la edad de inicio y la duración de la enfermedad. (99)

La PrPC se expresa en varios órganos y tejidos entre los que se encuentran el sistema inmune, la sangre, el estómago, el corazón e incluso el riñón. Sin embargo, el lugar de máxima expresión es el SNC sobre todo en regiones como bulbo olfatorio, cerebelo, estructuras límbicas y el complejo nigro-estriado. En las neuronas predomina especialmente en el botón sináptico, lo cual sugiere que pudiera tener un papel relevante en la sinapsis neuronal. (100)

Los diferentes estudios llevados cabo para caracterizar las funciones de PrPC, tanto *in vivo* como *in vitro*, han permitido establecer diferentes hipótesis sobre el papel fisiológico de esta proteína. Las investigaciones publicadas hasta la fecha relacionan PrPC con múltiples procesos celulares como crecimiento neurítico, neuroprotección o la transmisión sináptica

entre otros. Conocer correctamente los mecanismo moleculares sobre los que actúa PrPC es esencial ya que nos ayudaría a conocer más sobre la patología priónica así como al desarrollo de diferentes dianas terapéuticas. (101)

De entre las funciones estudiadas de la PrPC explicaremos a continuación las asociadas a desarrollo neurítico, neuroprotección y sinapsis.

## 2.6.1 PrPC Y DESARROLLO NEURÍTICO

Recientemente se ha mostrado que determinados ligandos (como la laminina) interactúan con PrPC. Estos ligandos están implicados en mecanismos de neuritogénesis por lo que la interacción con la PrPC puede ser importante para la estabilidad sináptica y la plasticidad neuronal. (102)

Por otro lado, estudios experimentales recientes han determinado un papel de PrPC en la regulación dinámica de las adhesiones focales durante la diferenciación neuronal, gracias a su capacidad de unión a  $\beta$ -integrina. Las adhesiones focales son estructuras que favorecen la conexión del citoesqueleto con la matriz extracelular. (103)

Además, se ha detectado una abundante expresión de PrPC en el sistema nervioso central en desarrollo durante la embriogénesis de ratones. Se observó que las células progenitoras neuronales indiferenciadas de la zona ventricular mitóticamente activas no expresaban PrPC, mientras que las neuronas post-mitóticas expresan gran cantidad de PrPC después de su última mitosis en el neuroepitelio, ya que migran hacia capas marginales y se diferencian. Por lo tanto, PrPC puede expresarse exclusivamente en neuronas diferenciadas, jugando un papel en la maduración y diferenciación neuronal. (104,105)

## 2.6.2 PrPC Y SINAPSIS

Como se ha comentado con anterioridad, PrPC puede encontrarse en diversas zonas de la neurona, pero sin duda su localización preferente es la hendidura sináptica. Esto nos lleva a pensar a que es probable que PrPC tenga un papel importante en la sinapsis neuronal, lo cual viene apoyado por las siguientes razones:

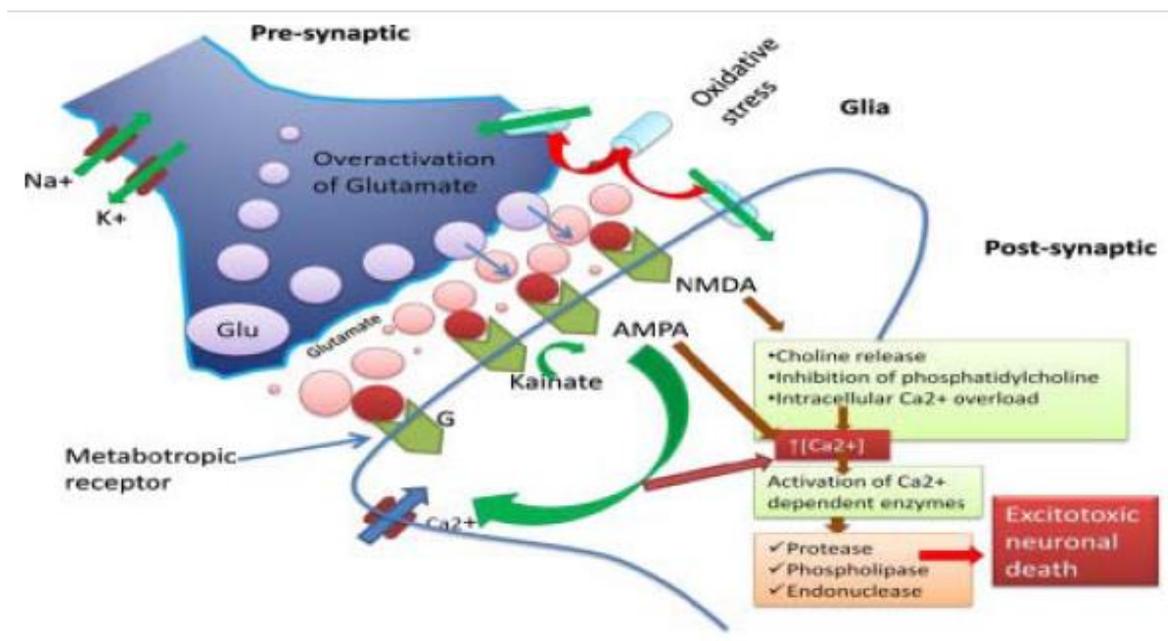
- Una de las principales características de la enfermedad priónica es la degeneración sináptica. (106)
- PrPC es capaz de unirse a cobre a través de una región de octapéptidos, participando de esta manera en la regulación de la homeostasis del calcio en la hendidura sináptica. (107)

- PrPC participa en la liberación de neurotransmisores en la hendidura sináptica mediante la interacción con proteínas asociadas. (108)
- PrPC es capaz de regular la actividad de diferentes receptores de glutamato en la hendidura sináptica. (109)
- PrPC forma parte de diferentes complejos de señalización junto a receptores y canales iónicos de membrana para favorecer la transmisión de la información. (110)

Todos estos hallazgos sugieren por lo tanto, la importancia de PrPC en el mantenimiento de la función sináptica. Además, su participación en el rol sináptico explicaría otras muchas de las funciones atribuidas a la PrPC como la señalización intracelular o el aprendizaje y la memoria.

### **2.6.3 PrPC Y NEUROPROTECCIÓN**

Uno de los principales mecanismos de muerte celular neuronal que se produce en enfermedades isquémicas y neurodegenerativas que afectan al SNC es el mecanismo de la excitotoxicidad. Este término se emplea para referirse a los efectos tóxicos derivados de una estimulación excesiva de los receptores de glutamato por neurotransmisores excitatorios. La sobreestimulación de los receptores glutamatérgicos da lugar a una cascada de eventos que incrementan el calcio intracelular. El aumento de calcio activa a diferentes enzimas involucradas en las vías de muerte celular por excitotoxicidad. (111) En la EA, las fibras de  $\beta$ -amiloide han demostrado capacidad para la activación de receptores neuronales RAGE que generan radicales libres de oxígeno y, de este modo, inducen una reacción inflamatoria y la producción de óxido nítrico (NO). Este NO tiene capacidad de salir al exterior y facilitar la liberación de glutamato desencadenando el fenómeno de excitotoxicidad. (Figura 12)



**Figura 12:** Mecanismo de excitotoxicidad (111)

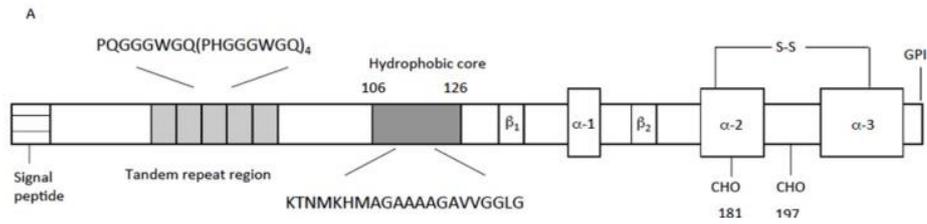
Si asumimos el rol de PrPC sobre los receptores de glutamato así como en la homeostasis del calcio en la hendidura sináptica, vemos por lo tanto que su presencia es un mecanismo neuroprotector contra este fenómeno. (112) Este fenómeno pudo observarse en ratones *knockout* que no expresaban esta proteína y presentaban por lo tanto más susceptibilidad a la excitotoxicidad. (113)

Además, se ha observado un papel de la PrPC en la supervivencia celular, ya que posee funciones antiapoptóticas (bloquea a la proteína Bax que interactúa con Bcl-2), antioxidantes e interactúa con diferentes quinasas relacionadas con mecanismos de supervivencia celular. (114)

## 2.7 PrNP Y DEMENCIA

Recientes estudios han determinado que las enfermedades priónicas comparten algunas características neuropatológicas con la EA, especialmente el depósito de proteínas mal plegadas en el tejido cerebral.

La PrPC es una proteína que se expresa en diferentes tejidos, siendo su presencia mayoritaria en el SNC. Se trata de una proteína de 253 aminoácidos altamente conservada y anclada a la membrana celular por el dominio GPI (Glucosil-fosfatidil- inositol). (Figura 13) (115)



**Figura 13:** Estructura de la proteína priónica (115)

Una de las características anatomopatológicas típicas de la EA son las placas amiloides. Estas placas son conglomerados anulares de cuerpos y prolongaciones neuronales degeneradas en torno a un depósito central de un péptido de longitud variable (de 40 o 42 aminoácidos) llamado  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). (116)

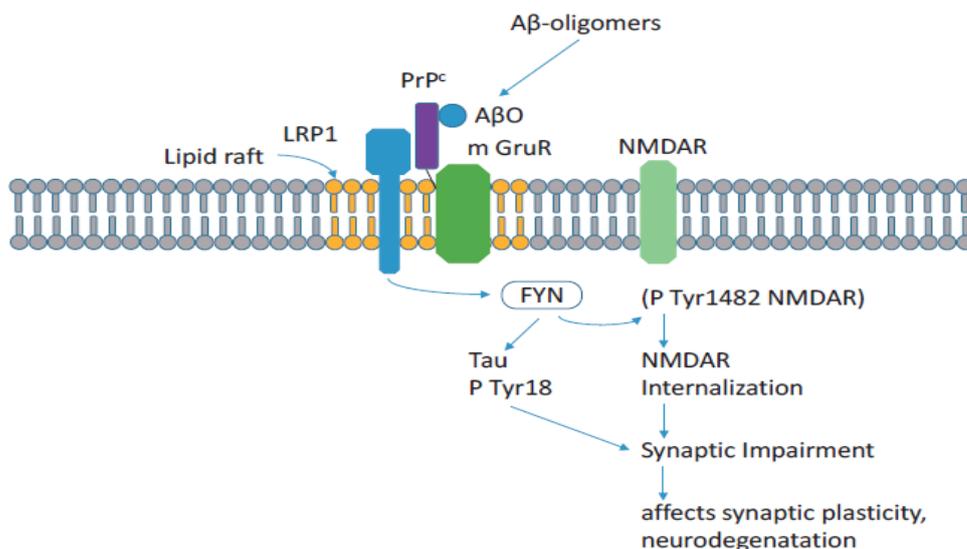
Este  $A\beta$  se forma a partir de la ruptura enzimática de la proteína precursora de amiloide (APP). La ruptura de la APP puede dar lugar a fragmentos solubles que no son patogénicos, o fragmentos no solubles que ponen en marcha la ruta amiloidogénica.

Si la enzima que se encarga de la ruptura es  $\alpha$ -secretasa, seguida a continuación de la acción de  $\gamma$ -secretasa se producirán fragmentos solubles de APP.

Sin embargo, cuando sobre APP actúa en primer lugar la  $\beta$ -secretasa seguido de la acción de  $\gamma$ -secretasa, se liberan fragmentos de  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  que ponen en marcha la ruta amiloidogénica. (116)

Recientemente se ha observado que PrPC regula de la función de la enzima  $\beta$ -secretasa, facilitando de esta manera la activación de la ruta amiloidogénica y la producción de oligómeros de  $\beta$ -amiloide. (117) (Figura 14)

Además, por otro lado, PrPC parece funcionar como un receptor para estos oligómeros de  $\beta$ -amiloide, favoreciendo la producción de proteína tau fosforilada responsable de la neurotoxicidad característica de la EA, desencadenando así disfunción sináptica y deterioro cognitivo. (117) (Figura 14)



**Figura 14:** Mecanismo por el que la PrPC se relaciona con EA: Los correceptores LRP1 y mGruR se agrupan con PrPC activando Fyn-cinasa. La Fyn-cinasa fosforila tanto a NMDA como a la proteína Tau. (117)

Por otro lado, recientemente se ha investigado la posibilidad de que  $A\beta_{42}$ , que se relaciona con la neurodegeneración en la EA, pueda actuar como ligando de PrPC, aunque el papel fisiológico de la proteína priónica como proteína de unión a  $A\beta_{42}$  no está claramente determinado. (117)

Lo que sí han podido demostrar Jung y cols. es que PrPC es fundamental para la autofagia mediada por  $A\beta_{42}$  en las neuronas. PrPC se une a la Beclina 1 (BECN 1) permitiendo de esta forma la activación de PI3KC3, y la activación de la autofagia. Este mecanismo, al parecer, se pondría en marcha ante la presencia de  $A\beta_{42}$ , mostrando una función beneficiosa de la proteína priónica como regulador positivo del complejo BECN1-PI3KC3. (118)

Se han realizado múltiples estudios sobre la distribución del polimorfismo del codón polimórfico Met129 del gen *PrNP* en EA con diferentes resultados. En algunas poblaciones europeas (holandesa, alemana y polaca), se informó que el codón polimórfico Met129 del gen *PrNP* actúa como un factor de riesgo para la EA (119, 120,121), mientras que en otros (italiana, americana y española) no lo fue. (122,123) Se llegó a una conclusión similar en un estudio japonés basado en una muestra grande de pacientes con EA donde el análisis genotípico del codón Met129 del gen *PrNP* no mostró relación con el inicio temprano (EO, *Early Onset*) o tardío (LO, *Late Onset*) de la enfermedad.(124) Por otra parte, un metanálisis reciente sobre

pacientes caucásicos concluyó que los homocigotos *PrNP* (tanto metionina como valina) tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar EA, independientemente de la edad de inicio de la enfermedad. (125) No obstante, un estudio propio que realizaron los autores de este metaanálisis en pacientes con EA esporádica de Italia y EEUU no se observó dicha asociación. (126)

# **CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y** **OBJETIVOS**

## CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVO

### 1. HIPÓTESIS

El envejecimiento de la población es un hecho confirmado que actualmente produce gran impacto médico, social y económico en nuestra sociedad. Parte de ese coste lo producen las demencias, ya que constituyen la primera causa de incapacidad y dependencia.

Los dos tipos de demencias más frecuentes, en nuestra población, son la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Demencia Vasculare (DV). A pesar de su alta incidencia ambas enfermedades siguen constituyendo un reto científico, ya que desconocemos la etiología de ambas.

La aparición de demencia se ha relacionado con ciertos perfiles genéticos, factores de riesgo vascular, enfermedades comórbidas y factores sociodemográficos y culturales. El conocimiento de estos factores así como la asociación entre ellos constituyen un punto clave para avanzar en el conocimiento de estas entidades y determinar factores pronósticos, etiológicos y así poder desarrollar nuevas dianas terapéuticas.

A pesar de la diversidad clínica y anatomopatológica, ambas entidades comparten algunos aspectos patogénicos fundamentales como aquellos relacionados con la reparación celular, muerte celular programada y autofagia. Por esta razón, la identificación y el estudio de genes relacionados con estos procesos podrían tener gran relevancia.

Los genes reparadores son esenciales para el correcto funcionamiento celular. Las proteínas codificadas por los genes reparadores detectan lesiones del DNA, activando la parada de ciclo celular e iniciando el proceso de reparación del mismo. *XRCC3* Thr241Met, *XRCC1* Arg399Gln y *ERCC2* Lys751Gln son tres de los polimorfismos presentes en genes reparadores del DNA más ampliamente estudiados, debido a su elevada frecuencia en la población general y a que inducen un cambio en la funcionalidad de la proteína que ha podido ser caracterizado.

Varios estudios han valorado la relación entre el polimorfismo Arg399Gln de *XRCC1* y la Enfermedad de Alzheimer con resultados no concluyentes, ya que aunque se intuía cierta relación no se observaron resultados estadísticamente significativos. (46) El estudio del polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2* en relación con la Enfermedad de Alzheimer tampoco ha arrojado resultados estadísticamente significativos. (56) El polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* ha sido ampliamente estudiado en relación a diferentes patologías tumorales, sin

## CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

embargo se desconoce la influencia en la Enfermedad de Alzheimer. Ninguno de los tres polimorfismos se ha estudiado en la Demencia Vascular.

La activación del factor de transcripción y supresión tumoral *TP53* puede desencadenar apoptosis en las neuronas. La activación de *TP53* en las neuronas se produce tras el daño del DNA iniciado por hipoxia. *TP53* aumenta el nivel de proteínas que liberan citocromo c en la mitocondria y se une a proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2. (65) Se ha relacionado el polimorfismo Arg72Pro del gen *TP53* con mal pronóstico funcional tras un ictus isquémico o hemorrágico, pero no existen estudios publicados en Demencia Vascular; y en Enfermedad de Alzheimer son escasos.

La autofagia es una vía de degradación lisosomal fundamental para el control de la calidad de las proteínas neuronales. La autofagia se relaciona con la capacidad para degradar ciertas sustancias y, por tanto, alteraciones en esta vía favorecerían la formación de agregados de proteínas intracitoplasmáticas relacionados con determinadas enfermedades neurodegenerativas; como es el caso de la alfa sinucleína en formas de Enfermedad de Parkinson, la proteína tau en la Enfermedad de Alzheimer y la proteína relacionada con la poliglutamina huntingtina en la Enfermedad de Huntington. Sin embargo, se desconoce el papel de la autofagia en el desarrollo de Demencia Vascular. (69)

*PrPN* es un gen de aproximadamente 20 kbp que se localiza en el cromosoma 20 y que codifica una glicoproteína denominada PrPC cuya función fisiológica, aunque ligada a la membrana, aún se desconoce. La proteína codificada contiene una región altamente inestable de cinco repeticiones de octapéptidos en tándem. Recientemente, se ha observado que PrPC puede ejercer como proteína neurotóxica al actuar como ligando de un oligómero A $\beta$  relacionado con la neurodegeneración de la Enfermedad de Alzheimer. (101).

# CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 PRIMARIOS**

En este trabajo pretendemos determinar si existe un mayor riesgo de desarrollar Demencia Vascul ar o Enfermedad de Alzheimer en función de las diferentes variantes de polimorfismos de genes relacionados con la reparación celular (Arg399Gln del gen *XRCC1* [rs25487], Lys751Gln del gen *ERCC2* [rs13181], Thr241Met del gen *XRCC3* [rs861539]), la apoptosis (Arg72Pro del gen *Tp53* [rs1042522]), la autofagia (Gln1383Glu del gen *ATG2B* [rs3759601], Thr300Ala del gen *ATG16L1* [rs2241880], Thr212Met del gen *ATG10* [rs1864483] y polimorfismo intrónico del gen *ATG5* [rs2245214]) y el polimorfismo Met129Val (rs1799990) del gen de la proteína priónica

### **2.2 SECUNDARIOS**

- 1) Describir las características clínicas y epidemiológicas generales de la muestra.
- 2) Analizar si las diferentes variantes de los polimorfismos estudiados pueden variar la susceptibilidad a padecer DV cortical o DV subcortical.
- 3) Estudiar si el polimorfismo Met129Val del gen *PrPN* constituye un factor de riesgo para padecer Enfermedad de Alzheimer.
- 4) Analizar la posible relación de la edad y del alelo  $\epsilon 4$  del gen *APOE* con las variantes genéticas estudiadas.
- 5) Determinar si los polimorfismos analizados constituyen un factor de riesgo para padecer una enfermedad más rápida en aquellos casos con Enfermedad de Alzheimer.

# **CAPÍTULO 3: PACIENTES Y** **MÉTODOS**

## **CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS**

### **1. DISEÑO Y ÁMBITO DEL ESTUDIO**

Para llevar a cabo el trabajo diseñamos un estudio observacional de casos y controles, en el que los sujetos fueron seleccionados en función de la presencia (casos) o no (controles) de demencia.

Los sujetos del estudio fueron reclutados en las áreas sanitarias del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA) y del Complejo Asistencial de Ávila. El Área de Salud de Salamanca, según los datos del INE, tenía adscrita con fecha 1 de enero de 2016 una población de 335.985 habitantes, de los cuales 86.717 (un 25,81% del total) eran mayores de 65 años. El Área de Salud de Ávila contaba con 162.514 habitantes, de los cuales 41.241 (el 25,37%) tenían más de 65 años (6). Las demencias constituyen un motivo de consulta frecuente en las áreas donde se realizó el estudio ya que Salamanca y Ávila ocupan el octavo y noveno lugar, respectivamente, entre las provincias con mayor proporción de personas mayores en España.

Para llevar a cabo los objetivos se recogieron una serie de datos clínicos y muestras biológicas tras la cuales se diseñó una fase de trabajo de laboratorio. Finalmente, se procesaron los resultados obtenidos.

### **2. MUESTRA**

#### **2.1 PACIENTES**

Se seleccionaron 225 pacientes con el diagnóstico de demencia vascular (grupo DV) vistos en el Servicio de Neurología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca entre septiembre de 2005 y enero de 2007 y entre mayo de 2014 y marzo de 2015 y en la Sección de Neurología del Complejo Asistencial de Ávila; desde marzo hasta septiembre de 2011. En su mayoría fueron pacientes valorados en Consultas externas de Neurología. El diagnóstico de DV probable se realizó por un neurólogo siguiendo los criterios NINDS-AIREN (10) tras la anamnesis, la exploración física, el estudio neuropsicológico (incluido el examen mini-mental (MMSE) (127) y los estudios de neuroimagen (TC y/o RM cerebral).

Se habían aplicado, además, los análisis recomendados por *The Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology* (128) que incluyen hemograma, electrolitos (incluido calcio), uremia, glucemia, creatinina, pruebas de función hepática, T4

libre, TSH y vitamina B12. La presencia de tumores y/o enfermedad inflamatoria crónica se consideraron criterios de exclusión. Tampoco se incluyeron en el estudio pacientes que presentaran rasgos de DV y EA a la vez (demencia mixta).

Los pacientes con DV se agruparon según la forma clínico-patológica que presentaban:

- **DV cortical (DV cortical):** Los casos con infartos corticales en arterias cerebrales de calibre mediano-grande (infartos aterotrombóticos, embolia arterio-arterial, cardioembolia o infartos en territorios fronterizos). Esta forma clínico-patológica es la que más se ajusta al cuadro clásico de demencia de inicio agudo y evolución escalonada con empeoramientos relacionados con nuevos eventos vasculares y periodos de mejoría o estabilización.
- **DV subcortical (DV subcortical):** Incluye los pacientes con infartos lacunares o lesiones vasculares de la sustancia blanca periventricular y profunda por enfermedad de los vasos pequeños cerebrales. En esta forma, es habitual que la instauración del cuadro sea insidiosa con un curso lento y progresivo. Puede haber episodios agudos de déficit neurológico focal, pero en la mayoría de estos pacientes nunca se produce un ictus agudo como tal.

Los casos de DV por infarto estratégico se catalogaron como DV cortical (cuando estos se producían por infarto del giro angular, hipocampo, lóbulo frontal o parietal) o DV subcortical (cuando estos se producían en tálamo, núcleo caudado o cápsula interna).

Para homogeneizar la muestra, se descartaron 4 pacientes con demencia atribuible a hipoperfusión y/o hipoxia o demencia por hemorragia cerebral. Se rechazaron 4 pacientes con tumores, 1 con enfermedad de Crohn y 8 debido a que la cantidad de ADN obtenido era insuficiente y no permitía el estudio genético completo. El número final de casos con DV analizados es de 208 (102 con DV cortical y 106 con DV subcortical).

Por otra parte, se seleccionó un segundo grupo de 230 pacientes con enfermedad de Alzheimer (grupo EA) que habían sido atendidos en Consultas externas del Servicio de Neurología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca entre mayo y diciembre de 2014 y en consultas externas de la Sección de Neurología del Complejo Asistencial de Ávila y/o que acudían a talleres de estimulación cognitiva o se encontraban institucionalizados en el Centro de Referencia Estatal de atención a personas con enfermedad de Alzheimer y otras demencias de Salamanca, en el Centro de la Asociación de Familiares de enfermos de

## CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS

Alzheimer de Ávila o en el Centro Residencial Decanos de Ávila entre mayo de 2011 y enero de 2012. El diagnóstico de EA probable se realizó por un neurólogo según los criterios del *National Institute on Aging y la Alzheimer's Association* (4) tras la anamnesis, la exploración física, el estudio neuropsicológico (incluido el examen mini-mental (MMSE) (27) y los estudios de neuroimagen (TC y/o RM cerebral). También se habían aplicado los análisis recomendados por *The Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology* (128). Se consideraron criterios de exclusión los pacientes con eventos cerebrovasculares (ECV), tumores o enfermedades inflamatorias crónicas.

De los pacientes 230 pacientes reclutados con EA, cuatro se excluyeron por no disponer de datos clínicos suficientes para calcular la progresión de la enfermedad, pues para determinar la variación del MMSE durante el seguimiento se requerían al menos tres evaluaciones diferentes (basal más dos exámenes de seguimiento). Asimismo, no se incluyeron otros 2 pacientes con EA por tumores, 2 que presentaron un accidente cerebrovascular tras el diagnóstico de EA y 5 debido a que la cantidad de ADN obtenido era insuficiente. Finalmente, se analizaron un total de 217 casos de pacientes con EA.

### **2.2 CONTROLES**

Se seleccionaron 230 sujetos mayores de 70 años, en los que no existía evidencia clínica o psicométrica de deterioro cognitivo (grupo no demencia). En su mayoría fueron sujetos vistos en consultas de valoración preanestésica para cirugías oftalmológicas y traumatológicas, todos ellos originarios de la misma zona geográfica que los pacientes con DV y EA. El periodo de inclusión fue desde junio hasta noviembre de 2011. Del total de los pacientes reclutados, doce sujetos con historia de enfermedad neurológica –incluida ECV–, enfermedad psiquiátrica, infarto de miocardio, enfermedad vascular periférica, enfermedades inflamatorias crónicas o tumores fueron excluidos. Otros cuatro sujetos rehusaron participar en el estudio. Tras tener en cuenta los pacientes excluidos, los controles totales que se analizaron fueron 214.

### **3. ASPECTOS ÉTICOS**

De todos los pacientes y/o representantes legales (en caso de incapacitación) así como de los sujetos control se obtuvo un documento de consentimiento informado para la participación en este estudio así como para para la extracción de 10 ml de sangre periférica mediante venopunción (Anexo I).

Se mantuvo la confidencialidad de los datos personales y genéticos respetando en todo momento lo establecido por la legislación aplicable (Ley Organica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal; Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente, derechos y deberes en materia de información y documentación clínica y Ley 8/2003, de 8 de abril, sobre derechos y deberes de las personas en relación con la salud en Castilla y León). Se cumplieron los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas recogidos en la declaración de Helsinki y en el informe Belmont así como los contenidos en la Declaración Universal de la Unesco referentes al genoma humano. También se dio cumplimiento a la Ley Orgánica para la regulación del tratamiento automatizado de datos de carácter personal. Con independencia de la participación en el presente estudio, en los pacientes diagnosticados de demencia se llevó a cabo un seguimiento y reevaluaciones periódicas en consultas externas de Neurología. En ellas, se propuso el tipo de intervención adecuada al estadio de la enfermedad con arreglo a lo dispuesto en las Guía del Grupo de Estudio de Demencias de la Sociedad Española de Neurología (5).

### **4. MÉTODOS**

#### **4.1 RECOGIDA DE DATOS**

Para la recogida de datos se elaboró un protocolo que se detalla en el Anexo II. Los datos necesarios para dicho protocolo se recogieron a través de la historia clínica del paciente así como de la anamnesis, exploración física y test neuropsicológicos llevados a cabo por el neurólogo en la consulta. Durante todo el proceso se contó con un familiar y/o cuidador fiable del paciente que nos ayudara a contrastar todos los datos. A continuación, se detallan los datos y variables recogidas para la elaboración de este estudio.

##### **4.1.1 DATOS DE IDENTIFICACIÓN Y SOCIODEMOGRÁFICOS:**

Entre los datos de identificación recogidos se encuentran, fecha y lugar de nacimiento, número de historia y número de referencia de la muestra extraída para el posterior análisis de la misma en la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

En cuanto a las variables sociodemográficas se incidió especialmente en el nivel educativo.

La variable de nivel educativo se codificó en cuatro niveles: sujeto con escolarización inferior a los 8 años, escolarización hasta los 8-13 años, sujetos con título de estudios primarios, y sujetos con estudios hasta nivel secundario.

## CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS

### 4.1.2 DATOS CLÍNICOS:

Dentro de los datos clínicos recogidos se tuvieron en cuenta los factores de riesgo vascular, así como comorbilidades en pacientes con demencia que se detallan a continuación:

- **Hipertensión arterial:** Se consideraba que el paciente tenía hipertensión arterial cuando presentaba cifras  $\geq 140/90$  mmHg tomadas en dos o más medidas separadas de dos o más semanas, así como el diagnóstico previo de hipertensión arterial con tratamiento antihipertensivo.
- **Diabetes Mellitus:** Sujeto con síntomas y con hallazgo casual de glucemia de  $> 200$ mg/dl, glucemia en ayunas de 126 mg/dl, glucemia  $> 200$ mg/dl a las dos horas de sobrecarga oral de 75 mg de glucosa, o el diagnóstico previo de diabetes con tratamiento antidiabético.
- **Dislipemia:** Cifras de colesterol LDL  $> 115$  mg/dl o colesterol total  $> 190$  mg/dl, así como diagnóstico previo de dislipemia con tratamiento farmacológico y/o dietético.
- **Tabaquismo:** Cualquier consumo tabáquico así como a los ex fumadores de hace menos de 5 años.
- **Alcohol:** Se tuvo en cuenta una ingesta diaria de  $> 40$  g/día de etanol. A continuación se detalla una tabla con las equivalencias de gramos de alcohol y volumen de bebida para poder calcular el nivel de enolismo del paciente (Tabla 8, 129)

Tabla 8: Unidades de medida de los diferentes tipos de bebidas alcohólicas (129)		
BEBIDA	DOSIS	CONTENIDO DE ALCOHOL EN GRAMOS
Cerveza	Quinto/caña	10
	Mediana	15
Vino de mesa	Vaso pequeño	10
	Vaso grande	20
Carajillo	Vaso pequeño	8
Vinos dulces	Vaso pequeño	14
Cava	Copa	10
Vermut	Vaso pequeño	10
Licores/combinados	Copa/vaso	22
Licor de frutas	Vaso pequeño (chupito)	6

- **Enfermedad cerebrovascular:** Accidente isquémico transitorio (AIT) previo, ictus isquémico (teniendo en cuenta localización, tamaño, y etiología según la clasificación TOAST) (130) (ANEXO III), e ictus hemorrágico previo.

### 4.1.3 VARIABLES CALCULADAS:

- **Escala Clinical Dementia Rating de Hughes** (131,132) (ANEXO IV)

La escala *Clinical Dementia Rating* (CDR) de Hughes se empleó para la clasificación del estadio evolutivo de la demencia.

Se asigna a cada ítem (memoria, orientación...) la puntuación que le corresponda (0, 0.5, 1, 2 ó 3) de acuerdo con la casilla de la tabla que encaje mejor con el estado clínico del paciente. La afectación del área "memoria" tiene primacía para determinar el estadio general. Si al menos otras tres áreas son calificadas con la misma puntuación que la memoria, el grado de afectación de ésta es el que define el estadio general. Sin embargo, si tres o más categorías se gradúan por encima o por debajo de la calificación de la memoria, entonces predomina la puntuación de aquellas. La puntuación se expresa mediante el valor que resulte representativo según lo explicado en los párrafos anteriores. Por ejemplo, "CDR = 2", que se correspondería con una demencia en estadio moderado.

- **Mini Mental State Examination de Folstein** (127) (ANEXO V)

El Mini Mental State Examination (MMSE) de Folstein es el test de cribado para el screening cognitivo más empleado en la práctica clínica diaria. Se trata de un test breve (se administra en 10 minutos aproximadamente), de baja variabilidad y que permite una valoración grosera y rápida de los pacientes con demencia. Fue diseñado en 1975 por Folstein y cols. y evalúa una serie de capacidades cognitivas como la orientación, registro mnésico, atención y cálculo, recuerdo, lenguaje y praxis constructiva. Se puntúa de 0 a 30, estableciendo como punto de corte para el diagnóstico de demencia 24 puntos.

A partir de ese punto de corte se establecen diferentes categorías, así entre 23-21 sugiere una deterioro cognitivo leve, de 20-11 moderada y < 10 puntos demencia severa.

En caso de que la situación funcional del paciente no permita evaluar correctamente algún ítem (por ejemplo porque el paciente es invidente o está hemipléjico), se multiplica el total de puntos obtenidos por 30 y se divide entre la mayor puntuación posible.

Para obtener el máximo rendimiento y fiabilidad del MMSE se debe tener en cuenta la escolarización y la edad del paciente. Así Blesa y cols. (133) propusieron añadir un 1 a la

puntuación final en pacientes mayores de 76 años y restarlo en menores de 50. También propusieron restar un punto para aquellos sujetos con escolarización superior a los 17 años y sumarlo en caso de escolarización inferior a los 8 años.

Como se mencionó al definir los criterios de inclusión del grupo de pacientes con EA, éstos fueron evaluados en al menos tres ocasiones (basal más dos exámenes de seguimiento). Para el cálculo de la progresión de la enfermedad, se empleó la variación del MMSE durante el seguimiento. En concreto, para cada paciente, se registraron los valores del MMSE y su momento de administración, por ejemplo, en el momento del diagnóstico de EA (basal) y en el último punto con datos de seguimiento disponibles para la escala MMSE. Los pacientes con EA se clasificaron de acuerdo al punto de corte establecido por Cortés y cols (134) como de progresión rápida (individuos con tasa de variación del MMSE, disminución en la puntuación del MMSE/tiempo de seguimiento expresado en años, mayor de 4,5) o progresión normal (paciente con EA con decremento en la puntuación del MMSE por año menor o igual a 4,5).

### - **Inventario neuropsiquiátrico de Cummings (135)(ANEXO VI)**

El rendimiento psicométrico del Inventario Neuropsiquiátrico (Neuropsychiatric Inventory, NPI) es muy elevado para la valoración de los síntomas no cognitivos en los pacientes con demencia, y permite realizar un seguimiento de la eficacia de los tratamientos sobre esos aspectos. Incluye 12 ítems que evalúan diferentes áreas del comportamiento.

La información, es imprescindible que provenga de un informador fiable y sólo se tienen en cuenta cambios en el comportamiento tras el diagnóstico de demencia.

Cada ítem cuenta con una pregunta filtro inicial que identifica la presencia del síntoma en el último mes. En caso de respuesta afirmativa la entrevista se dirige a una serie de preguntas adicionales que permiten obtener información sobre la frecuencia y sobre la gravedad del síntoma. La puntuación para cada ítem es el valor resultante de multiplicar la frecuencia por la intensidad; y la puntuación total del NPI es el resultado de sumar las puntuaciones de todos los síntomas. El rango oscila de 0 hasta un máximo de 144, de forma que a mayor es el valor, más severa es la psicopatología. (136)

En el presente estudio se recogen específicamente los hallazgos de síntomas clínicamente relevantes (puntuación NPI  $\geq$  4) en los ítems 1. delirios, 2. alucinaciones y 4. depresión.

### 4.1.4 PRUEBAS COMPLEMENTARIAS:

#### - **Determinaciones en suero:**

En todos los pacientes reclutados para el estudio se llevaron a cabo las siguientes determinaciones en suero: hemograma completo, bioquímica, determinaciones de vitamina B12, ácido fólico y hormonas tiroideas.

#### - **Estudio de neuroimagen:**

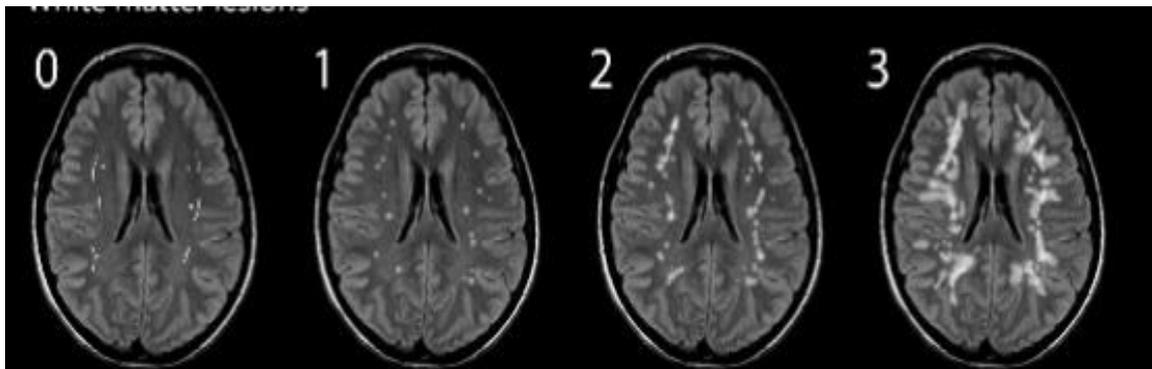
En todos los sujetos reclutados para el estudio se llevó a cabo, bien en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca o en el Complejo Asistencial de Ávila, una TC craneal o una RMN cerebral (Siemens 1,5 teslas). Las RMN cerebrales incluyeron las secuencias axiales en T2 y FLAIR y secuencias axiales y coronales en T1. El objetivo de la realización de dichas pruebas de imagen era evaluar la posible patología cerebrovascular y determinar la presencia de otras entidades que pudieran justificar el deterioro cognitivo.

Para la determinación de la presencia de patología cerebrovascular se tuvieron en cuenta los criterios NINDS-AIREN que evalúa la presencia o no de los siguientes parámetros:

- **INFARTO TERRITORIAL:** Se define como el infarto que se produce en algún punto del trayecto de uno de los grandes vasos cerebrales. El infarto puede ser más o menos extenso en función de la zona de la arteria obstruida. Este criterio se codificó de la siguiente manera:
  - Ausencia de infarto
  - Infarto de la arteria cerebral anterior (ACA)
  - Infarto de la arteria cerebral media (ACM)
  - Infarto del territorio posterior
  - Infarto de dos o más territorios
  
- **INFARTO EN TERRITORIO FRONTERA:** Se trata de infartos que se producen en la zona fronteriza entre dos territorios vasculares. Éste tipo de infarto se codificó de la siguiente manera:
  - Ausencia de infarto
  - Infarto frontera cortical: entre territorio frontera anterior (entre ACM y ACA) o en territorio frontera posterior (entre ACM y arteria cerebral posterior)
  - Infarto frontera interno: Se trata del infarto producido en territorios profundos de las arterias perforantes profundas y superficiales.

- **INFARTO LACUNAR:** Son infartos de pequeño tamaño (< 1,5 cm de diámetro) en el territorio de una arteria perforante cerebral, que puede presentarse con un conjunto de síntomas específicos (síndromes lacunares). Clásicamente se describen cinco síndromes lacunares: cuatro descritos por Fisher en los años 60 (hemiparesia motora pura, síndrome sensitivo puro, síndrome de disartria-mano torpe y paresia crural con hemiataxia ipsilateral) y otro descrito por Mohr (síndrome sensitivo-motor). Posteriormente se han descrito otros síndromes atípicos, menos frecuentes, que podrían llegar a ser menos del 10% de los infartos lacunares. Suelen localizarse en los ganglios de la base, cápsula interna, tálamo y protuberancia. (1) Este tipo de infarto se codificó de la siguiente manera:
  - Ausencia de infarto
  - Un solo infarto
  - Varios infartos ipsilaterales
  - Varios infartos bilaterales
- **INFARTO TALÁMICO:** Infartos en zona del tálamo de > de 3 cm. Se codificó de la siguiente manera:
  - Ausencia de infarto
  - Presencia de infarto
- **LEUCOARAIOSIS:** La leucoaraiosis es la pérdida difusa de la densidad a nivel de la sustancia blanca que radiológicamente se visualizan en el caso de la TC cerebral como hipodensidades difusas en sustancia blanca y en la RMN cerebral como hiperintensidades en sustancia blanca en secuencias T2. La clasificación del grado de leucoaraiosis se realizó a través de la escala ARWMC (Age Related White Matter Changes) de la European Task Force. (137) Se tuvieron en cuenta las lesiones mayores de 5 mm, en cinco regiones cerebrales diferentes por cada hemisferio: frontal, parieto-occipital, temporal, ganglios de la base e infratentorial y se clasificaron de 0 a 3 de la siguiente manera: 0: No hay lesión, 1: Dos o más lesiones no confluentes, 2: Lesiones confluentes y 3: Afectación difusa de la sustancia blanca con o sin implicación de las fibras U. (Figura 15)

Según la escala "Task Force" europea el diagnóstico de demencia se establece cuando existen al menos una puntuación de 3 en dos áreas y al menos otras dos áreas con puntuación de 2. En el presente estudio se realizó el diagnóstico de demencia vascular subcortical atendiendo a estos criterios.



**Figura 15:** Escala ARWMC; 0: No hay lesión, 1: Dos o más lesiones no confluentes, 2: Lesiones confluentes y 3: Afectación difusa de la sustancia blanca con o sin implicación de las fibras U (137)

### 5. ESTUDIO GENÉTICO

#### **5.1 OBTENCIÓN DEL DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA**

Se obtuvo el DNA genómico de cada individuo a partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica obtenida mediante venopunción en la región antecubital, previo consentimiento informado.

Las muestras fueron procesadas por el departamento de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca siguiendo el siguiente proceso:

Las células nucleadas de la sangre se aislaron mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50mL de agua bidestilada -ddH<sub>2</sub>O- durante 30 minutos, a 4°C y a 1500 rpm). Tras la recuperación de la interfase creada y lisis de los hematíes con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0.25M Sacarosa; 50mM Tris-HCl pH: 7.5; 25mM KCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>) y se precipitaron mediante centrifugación a 580 g durante 20 minutos.

El botón de células nucleadas de la sangre se resuspendió en tampón Fornace a una concentración estimada de  $5 \times 10^6$  células/mL, tras lo cual se añadió EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, concentración final 10 mM), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, concentración final 1%) y Proteinasa K (concentración final 50 µg/mL). La mezcla se incubó a 55 °C durante 8 - 16 horas. Tras la incubación, se obtuvo el DNA por el método de extracción con fenol y cloroformo, anteriormente descrito.

## CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS

La concentración y el grado de contaminación proteica del DNA así obtenidos se calcularon tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (*GeneQuant, Pharmacia*) por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de ADN/mL} = (\text{D.O.}_{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)^*$$

*\*50 es un factor de corrección introducido ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de absorbancia que tienen 50  $\mu\text{g}$  de DNA/mL*

El cociente  $\text{D.O.}_{260}/\text{D.O.}_{280}$  se utiliza para determinar el grado de pureza, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.7 y 2.0. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del DNA. Valores superiores parecen indicar un exceso de RNA, el cual se eliminó tratando la solución de DNA con RNAsa y purificando nuevamente según el método antes descrito.

La muestra de DNA con una concentración aproximada entre 1 y 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , se almacenó en tubos Eppendorf® a -20 °C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como su posible contaminación por microorganismos.

### 5.2 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE GENES (RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA, REPARACIÓN DE DNA, TP53, PrNP Y APOE)

Los estudios de discriminación alélica se realizan fundamentalmente mediante dos métodos: el análisis de los *polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción* (RFLP) y la *PCR en tiempo real*, (qQRT-PCR).

Los polimorfismos relacionados con la autofagia, reparación del DNA, la PRNP se analizaron mediante qQRT-PCR. El estudio de TP53 se inició mediante RFLP. Posteriormente, se adquirió StepOne System (Applied Biosystems, Foster City, CA), y se completó el estudio mediante qQRT-PCR.

#### 5.2.1 DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE RFLP

El estudio de polimorfismos en función de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*) permite discriminar los alelos de un polimorfismo analizando el tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del producto de PCR con

## CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS

endonucleasas de restricción, que reconocen secuencias específicas en el DNA y lo escinden en ese punto. (138)

Mediante RFLP se estudiaron 150 casos de EA, 150 casos de DV y 150 controles de TP53 Arg72Pro.

Para ello, se amplificó mediante PCR un fragmento de 291 bp del exón 4 donde se localiza el polimorfismo. Utilizándose los siguientes oligonucleótidos cebadores (139):

5`-TGC CGT TCC CCC TGA CAT CT-3` (sentido)

5`- CTG ACC GTG CAA GTC ACA GA-3` (antisentido)

Posteriormente, se digirieron 13  $\mu$ L del producto de PCR con 10 U (1  $\mu$ L) de la enzima de restricción BstU-I (*Bsh1236I*, *Fermentas Life Sciences, Burlington, Ontario, Canada*) durante 6 horas a 37 °C en un volumen final de 20  $\mu$ L. (140) Los fragmentos obtenidos fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa generando los siguientes genotipos:

- Genotipo G/G (homocigoto Prolina): un fragmento de 291 pb
- Genotipo C/C (homocigoto Arginina): dos fragmentos de 165 y 126 pb
- Genotipo C/G (heterocigoto Arginina/Prolina): tres fragmentos de 291, 165 y 126 pb

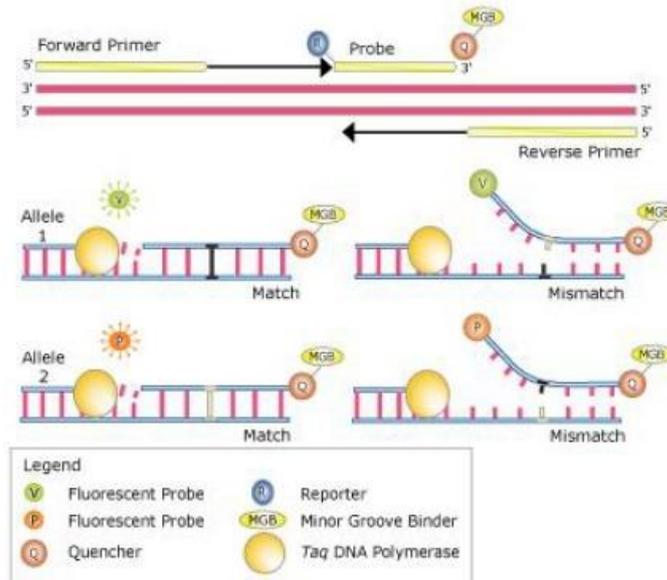
### 5.2.2 DISCRIMINACIÓN ALÉLICA MEDIANTE QRT-PCR

Higuchi describió en 1993 una técnica que permitía detectar los productos de la PCR a medida que se iban acumulando y la denominó *Real Time-PCR* (QRT-PCR) (138). Esta técnica, sigue el mismo procedimiento de una PCR convencional, pero la amplificación tiene lugar en presencia de unos componentes capaces de emitir fluorescencia, lo que permite conocer y registrar la cinética de la amplificación en todo momento. Existen dos métodos principales para esta cuantificación: el primero consiste en la adición de sustancias intercalantes del DNA como el bromuro de etidio, mientras que el otro emplea sondas que emiten fluorescencia al hibridar con la secuencia complementaria (141). En este caso, se han empleado sondas TaqMan®, marcadas con los fluorocromos VIC y FAM, (tabla 9) uno para cada alelo de los genes estudiados.

Tabla 9: Moléculas fluorescentes utilizadas en la reacción de PCR con sondas TaqMan®		
Fluorocromo	Máx. $\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	Máx. $\lambda_{\text{abs}}$ (nm)
VIC	538	554
FAM	495	435

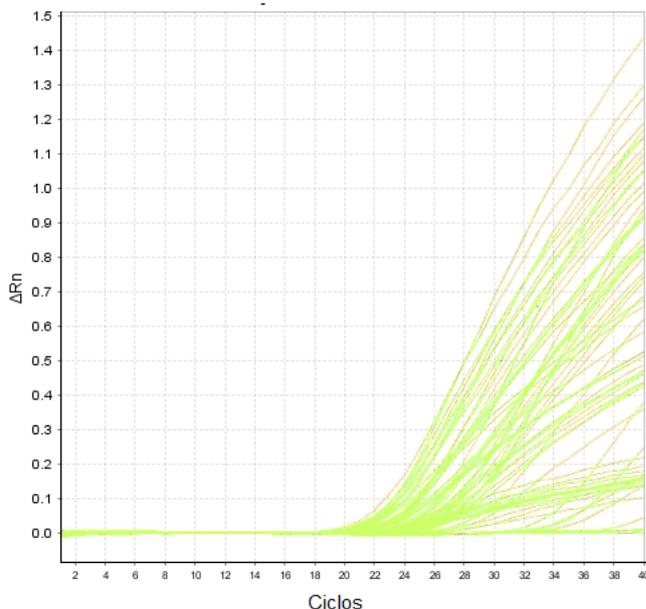
## CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS

Estas sondas, complementarias para una secuencia específica, presentan un donador en el extremo 5' y un aceptor (*quencher*) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia emitida por el donador cuando los extremos de la sonda están próximos, lo que sucede mientras la sonda está intacta. (Figura 16)



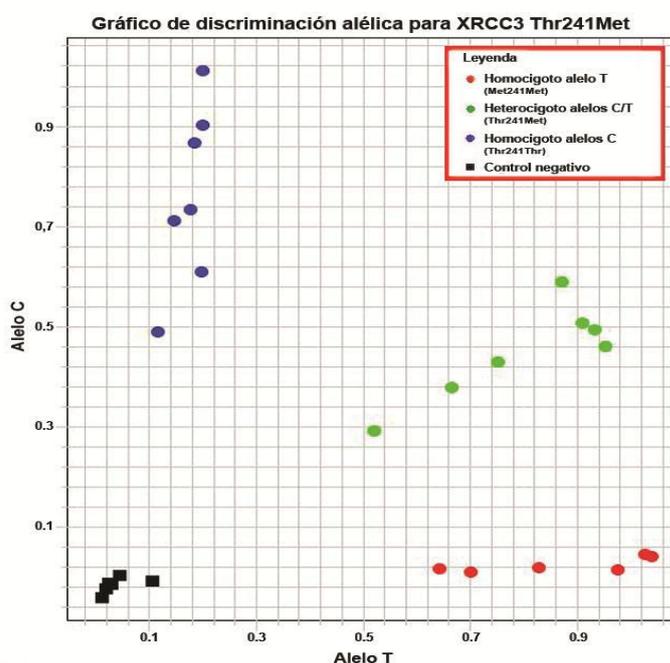
**Figura 16:** Mecanismo de la PCR con sondas Taqman<sup>®</sup>.

Además de estas sondas, la QRT-PCR precisa de los mismos elementos que una PCR convencional (oligonucleótidos o *primers*, dNTPs, Taq polimerasa y solución tampón). Durante el anillamiento, tanto los oligonucleótidos como las sondas fluorescentes se unen a las cadenas de DNA. Taq polimerasa tiene además actividad 5'-3' exonucleasa de modo que si mientras realiza la extensión de una molécula de DNA a partir de un *primer*, encuentra una sonda unida a esa cadena, la hidroliza. Al separarse el fluoróforo y el aceptor, la fluorescencia ya no es absorbida, de modo que la fluorescencia liberada tras la excitación de la muestra con un láser es detectada por el lector, y es proporcional al número de moléculas de doble cadena que se han formado como producto de la PCR. (142)(Figura 17)



**Figura 17:** Emisión de fluorescencia en una QRT-PCR a medida que tienen lugar los ciclos de amplificación (*StepOne®*)

Al mismo tiempo, el sistema identifica cuál es el fluorocromo (VIC o FAM) que está emitiendo, y por lo tanto discrimina cuál es el SNP presente en cada una de las secuencias. En la figura 18 se muestran como ejemplo los resultados de discriminación alélicas de XRCC3. Cada uno de los puntos representa una muestra estudiada. En el caso de los individuos C/C, solo se une la sonda marcada con FAM (representado en azul), mientras que en el caso de los individuos T/T, solo se une la sonda marcada con VIC (rojo). El sistema representa en verde los genotipos C/T en el que se unen ambas sondas. Los cuadraditos negros representan las muestras sin DNA que se emplean como control.



**Figura 18:** Discriminación alélica de XRCC3 Thr241Met (Allelic Discrimination Programme, Applied Biosystem)

## CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS

Las reacciones de PCR se realizaron con 5 µl de los productos comerciales para QRT-PCR TaqMan® Universal PCR Master Mix y TaqMan® Genotyping Mastermix© (*Applied Biosystem, Foster City, CA*). Se añadió 0.5 µl del preparado comercial TaqMan® SNP Genotyping Assays, que contiene los *primers* con las sondas y 0.5 µl de ADN y 4.25 µl de H<sub>2</sub>O, para un volumen final de 10 µl. La tabla 10 recoge los polimorfismos utilizados para el estudio de cada SNP. Se emplearon placas de 96 pocillos en las que a modo de control de una posible contaminación, se incluyeron preparaciones que contenían todos los reactivos citados, excepto los DNA problema.

Tabla 10: Polimorfismos estudiados mediante discriminación alélica con sondas TaqMan®		
Gen	Polimorfismo estudiado	Sonda Taqman (Applied Biosystems)
ATG2B Gln1383Glu	rs3759601	C_9690166_10
ATG5 SNP intrónico	rs2245214	C_3001905_20
ATG10 Thr212Met	rs1864483	C_11953871_20
ATG16L1 Thr300Ala	rs2241880	C_9095577_20
XRCC1 Arg194Trp	rs1799782	C_622564_10
ERCC2 Lys751Gln	rs13181	C_3145033_10
XRCC3 Thr241Met	rs861539	C_890125_10
TP53 Arg72Pro	rs1042522	C_2403545_10
PrNP Met129Val	rs1799990	C_2969398_10
APOE +334T>C	rs429358	C_3084793_20

Una vez optimizadas para cada gen, las amplificaciones se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

40 CICLOS	}	Desnaturalización inicial	92°C.....10 min
		Desnaturalización	92°C.....15 seg
		Anillamiento	60°C / 56°C.....1.15 min
		Extensión	60°C.....1 min

## CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS

La lectura de fluorescencia se realizó antes y después de la amplificación mediante el sistema StepOne® (*Applied Biosystem, Foster City, CA*) utilizando el software Allelic Discrimination Program (*Applied Biosystem, Foster City, CA*) para la determinación del alelo presente en cada una de las muestras.

Con este método, se realizó el estudio de los genes reparadores de DNA, genes relacionados con la autofagia, PrNP, APOE así como 67 pacientes con EA, 58 pacientes con DV y 64 controles de TP53 Arg72Pro. Así mismo, se eligieron de forma aleatoria 15 pacientes y 15 controles en los que previamente se habían estudiado TP53 Arg72Pro mediante PCR-RFLP. Puesto que los resultados fueron completamente reproducibles, se decidió no repetir mediante QRT-PCR el análisis de los casos y controles restantes.

### **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Para la recogida de datos se diseñó un formulario específico en Microsoft Office Access versión 2003. Una vez recogidos los datos el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 21 (SPSS Inc, Chicago, IL, Estados Unidos).

El primer paso del análisis estadístico fue la realización de un análisis descriptivo de variables clínicas y demográficas de todos los casos de EA, DV y de los controles.

Para las variables categóricas nominales y ordinales se calculó la proporción de pacientes en cada categoría, y para las variables cuantitativas se utilizaron la media y desviación estándar cuando la distribución era normal, y la mediana y cuartiles en caso de distribuciones no normales.

Se completó el análisis estadístico con un estudio inferencial donde se realizaron diferentes comparaciones entre distintas variables. Para la realización de este estudio se emplearon los siguientes estadísticos:

Para comprobar que variables seguían una distribución normal se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov.

Si las variables eran cualitativas utilizamos el análisis de tablas de contingencia, con el test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson y el estadístico de Fisher para muestras con menos de 5 sujetos, expresando la magnitud de la asociación mediante la odds ratio (OR), y la precisión mediante el intervalo de confianza de la OR.

Para comparar dos variables continuas se utilizó el test T de Student para distribuciones normales y la U de Mann-Whitney para distribuciones no normales.

Para comparar el comportamiento de una variable continua en diferentes situaciones se utilizamos el test de ANOVA para distribuciones normales y el test de Kruskal-Wallis para distribuciones no normales.

Utilizamos coeficientes de correlación, el coeficiente de correlación lineal de Pearson y su análogo no paramétrico de Spearman, para establecer la relación entre dos variables continuas.

En todos los casos se utilizó un nivel de significancia estadística menor de 0,05.

Para determinar que la muestra no estaba sesgada por una distribución estratificada de las variantes polimórficas debidas a un apareamiento no aleatorio, se determinó la frecuencia alélica de las muestras mediante el estadístico Chi-cuadrado con las frecuencias alélicas esperadas por el principio de Hardy-Weinberg.

El análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en las poblaciones muestreadas se corroboró mediante test exactos basados en cadenas de Markov, efectuados con el paquete estadístico GENEPOP 3.4 (Raymont & Rousset, 1995).

La existencia de desequilibrios de ligamiento se comprobó mediante el test exacto de Fisher con el paquete estadístico GENEPOP 3.4 y cadenas de Markov.

Este programa y cadenas de Markov también se emplearon para determinar la existencia de diferencias en las frecuencias alélicas (test exacto de Fisher) y genotípicas (test exacto basado en log-likelihood) entre las submuestras de casos y controles. Para construir las cadenas de Markov se utilizaron 10.000 dememorizaciones, 1.000 lotes (*batches*) y 10.000 iteraciones por lote. En todas las comparaciones se utilizó la corrección de Bonferoni.

Mediante análisis multivariable (regresión logística múltiple) se valoró la asociación entre los distintos tipos de demencia o no demencia asociada al alelo y a los genotipos, considerando la

## CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS

corrección de Bonferoni para comparaciones múltiples. Para este análisis los datos se procesaron con el paquete estadístico SPSS.

Estos datos también se pueden analizar, asumiendo un modelo genético preestablecido, como los que se explican a continuación:

- **Modelo dominante:** Se refiere a que, ser portador de un determinado alelo incrementa el riesgo de padecer la enfermedad. Es decir portar una única copia de A es suficiente para modificar el riesgo de enfermedad, y que el portar dos copias de AA modifica el riesgo igual que portar uno sola. En resumen los heterocigotos AB y los homocigotos AA tienen el mismo riesgo. Estos dos genotipos se pueden comparar con los homocigotos BB.
- **Modelo recesivo:** Es necesario portar dos copias del mismo alelo para incrementar el riesgo de padecer enfermedad. Es decir, los homocigotos BB y los heterocigotos AB tienen el mismo riesgo de modificar la enfermedad, y se pueden comparar con el modelo homocigoto AA.
- **Modelo codominante:** Cada genotipo produce un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se comparan homocigotos y heterocigotos de las variantes por separado con la variante homocigota del genotipo más frecuente.

Debido a la dificultad para hallar un criterio para establecer el modelo de herencia más adecuado para un polimorfismo se comparó el ajuste del modelo codominante (que es los más generales; 2 parámetros) con los demás modelos (1 parámetro).

Estas comparaciones se realizaron mediante el test de razón de verosimilitudes. Además se calcularon las OR de asociación entre cada genotipo y la enfermedad y los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95%.

Por último, el papel de cada polimorfismo en la tasa de variación del MMSE (disminución en la puntuación del MMSE/tiempo de seguimiento expresado en años) se evaluó mediante el uso de un modelo lineal general, donde los efectos del genotipo sobre los fenotipos de progresión de la enfermedad se calcularon mediante un análisis de regresión logística, tras ajustar por factores clásicos que habitualmente afectan a la progresión de la EA como la edad al

## CAPÍTULO 3: PACIENTES Y MÉTODOS

---

diagnóstico, el sexo, el nivel educativo, la presencia de depresión y/o síntomas psicóticos, el tratamiento con cualquier inhibidor de la acetilcolinesterasa, memantina, o ambos y el tiempo de seguimiento (143)

## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS**

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### **1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA EMPLEADA PARA EL ANÁLISIS DE LOS GENES REPARADORES DE DNA, AUTOFAGIA Y PROTEÍNA PRIÓNICA:**

Para la realización de este trabajo, finalmente, se han empleado un total de 200 casos con Enfermedad de Alzheimer, 200 casos con Demencia Vasculare y 201 controles. Entre los casos de Demencia Vasculare 99 casos eran de gran vaso y 101 de pequeño caso. Respecto a los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, 35 presentaron una rápida progresión y 165 una evolución normal de la sintomatología.

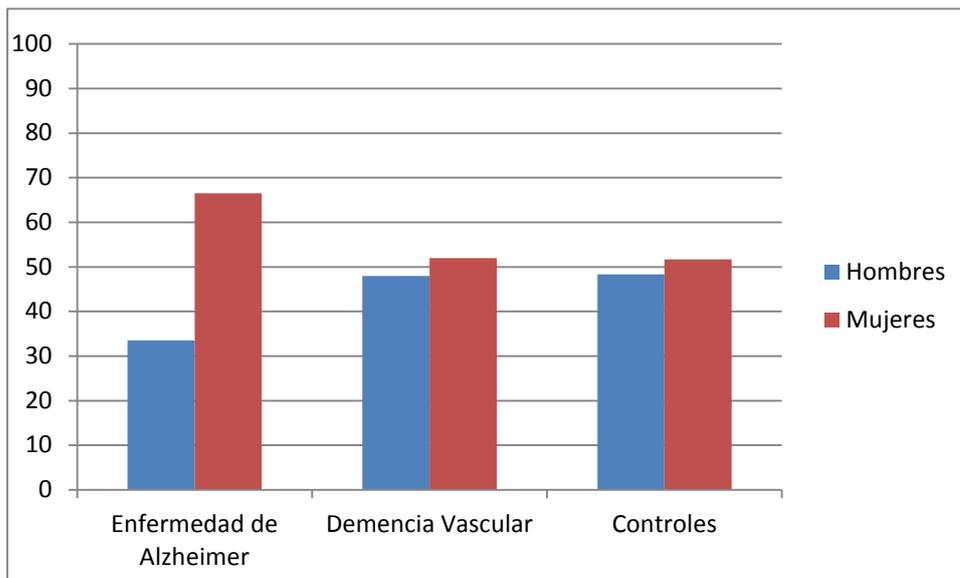
### **2. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA MUESTRA**

#### **2.1: SEXO:**

Respecto al sexo la distribución de mujeres y hombres fue similar entre el grupo de Demencia Vasculare y los controles (52% de mujeres y 48% de hombres en el caso de la Demencia Vasculare y 51,7% de mujeres y 48,3% de hombres entre los controles). Sin embargo, en el grupo de casos de Enfermedad de Alzheimer se observó un porcentaje más alto de mujeres (66,5%) que de hombres (33,5%), siendo las diferencias entre estos dos grupos estadísticamente significativas ( $p= 0,003$ ). (Figura 19, tabla 11).

**Tabla 11:** Distribución de los sujetos de la muestra por sexo

	<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER n=200</b>	<b>DEMENCIA VASCULAR n=200</b>	<b>CONTROLES n=201</b>
<b>HOMBRE N (%)</b>	67 (33,5%)	96 (48%)	97(48,3%)
<b>MUJER N (%)</b>	133 (66,5%)	104 (52%)	104 (51,7%)

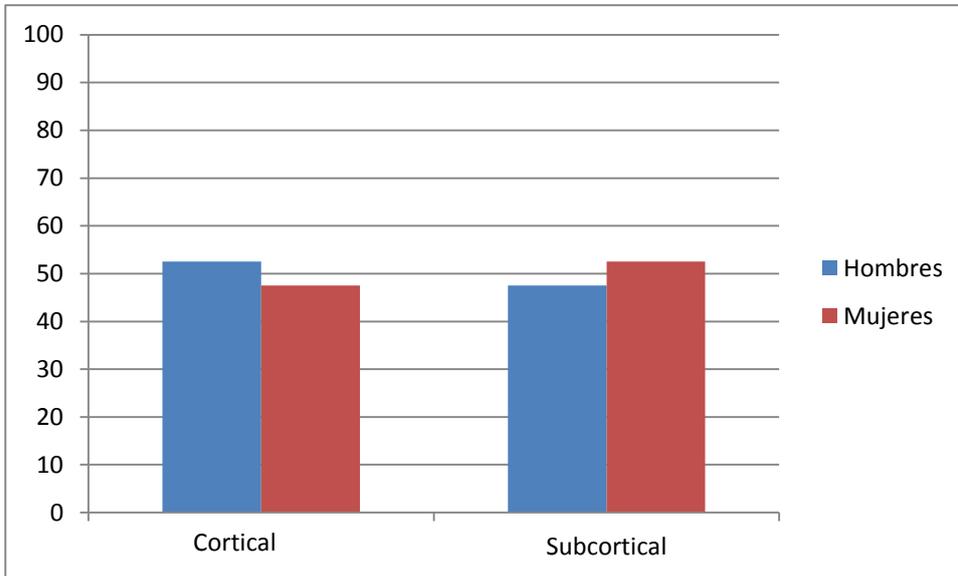


**Figura 19:** Porcentaje de hombres y mujeres en cada grupo de estudio

En cuanto a la diferencia por sexo dentro del grupo de Demencia Vascular, se observaron porcentajes similares entre hombres y mujeres (47,5% de mujeres y 52,5% de hombres para demencia vascular cortical (DVC), y 52,5% de mujeres y 47,5% de hombres en demencia vascular subcortical (DVSC)), sin diferencias estadísticamente significativas por subtipos en comparación al grupo control. (Tabla 12, Figura 20)

**Tabla 12:** Distribución de los sujetos de la muestra por sexo según subtipo de demencia vascular

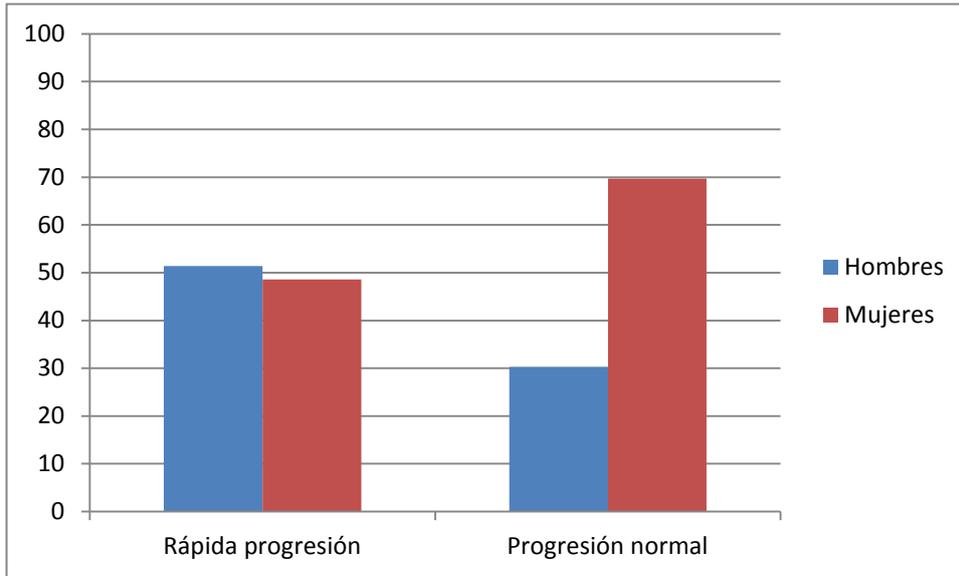
	DV CORTICAL n=99	DV SUBCORTICAL n=101
<b>HOMBRE N (%)</b>	52 (52,5%)	48 (47,5%)
<b>MUJER N (%)</b>	48 (47,5%)	53 (52,5%)



**Figura 20:** Porcentaje de hombres y mujeres según tipo de demencia vascular

En cuanto a la diferencia por sexo dentro del grupo de Enfermedad de Alzheimer, se observaron porcentajes similares de hombres y mujeres en el grupo de rápida progresión, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas con los controles. Sin embargo, en el grupo de progresión normal se observó un porcentaje mayor de mujeres (69,7%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa frente al grupo control ( $p= 0,0001$ ). (Tabla 13) (Figura 21)

<b>Tabla 13:</b> Distribución por sexos según progresión de EA		
	<b>RÁPIDA PROGRESIÓN n= 35</b>	<b>PROGRESIÓN NORMAL n=165</b>
<b>HOMBRE N (%)</b>	18 (51,4%)	50 (30,3%)
<b>MUJER N (%)</b>	17 (48,6%)	115 (69,7%)



**Figura 21:** Porcentaje de hombres y mujeres según la progresión de EA

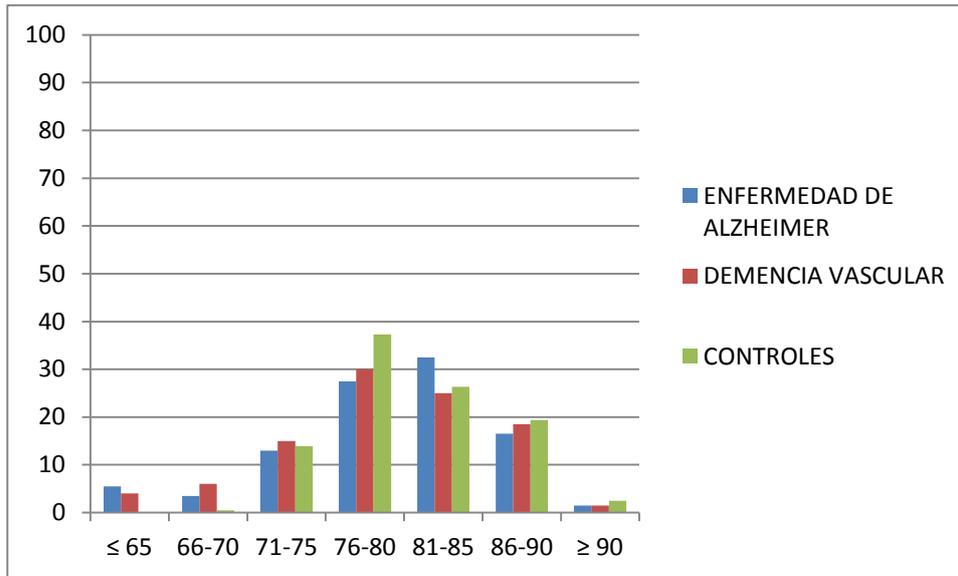
## 2.2: EDAD

La edad media de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer fue de 79,7 ( $\pm$  6,7) años; la de los pacientes con Demencia Vascul ar de 79,3 ( $\pm$ 6,7) años y la de los controles de 81 años ( $\pm$ 4,9) años. Como ya se ha mencionado anteriormente, la edad es uno de los factores de riesgo principales para el desarrollo de demencia; por este motivo uno de los requisitos a la hora de seleccionar los controles fue que tuvieran 70 años o más para evitar en la medida de lo posible incluir sujetos que pudieran desarrollar una demencia en un futuro.

A continuación, estudiamos el comportamiento de nuestra muestra según los diferentes rangos de edad. En los tres grupos estudiados más de la mitad de los sujetos se encuentran comprendidos entre el rango de edad entre los 76 y 85 años de edad. (Tabla 14) (Figura 22)

**Tabla 14:** Frecuencias absolutas y relativas según los grupos de edad

	AÑOS N (%)						
	≤ 65	66-70	71-75	76-80	81-85	86-90	≥ 90
<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER n=200</b>	11 (5,5%)	7 (3,5%)	26 (13%)	55 (27,5%)	65 (32,5%)	33 (16,5%)	3 (1,5%)
<b>DEMENCIA VASCULAR n=200</b>	8 (4%)	12 (6%)	30 (15%)	60 (30%)	50 (25%)	37 (18,5%)	3 (1,5%)
<b>CONTROLES n=201</b>	0 (0%)	1 (0,49%)	28 (13,93%)	75 (37,31%)	53 (26,36%)	39 (19,4%)	5 (2,48%)

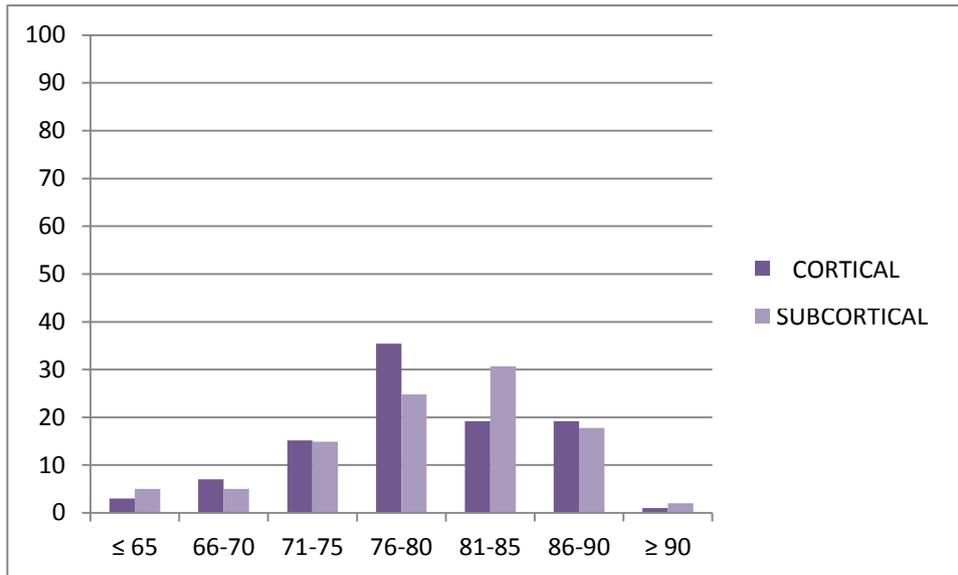


**Figura 22:** Porcentaje de distribución por edad de los sujetos del estudio

En cuanto a la edad media dentro de los pacientes con Demencia Vascular la edad media entre los pacientes con DV cortical es de 79,1 años ( $\pm 6,7$ ), y la de aquellos con DV subcortical de 79,5 años ( $\pm 6,8$ ). Las diferencias entre los diferentes subtipos de Demencia Vascular fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p=0,006$ ,  $p=0,034$  respectivamente).

A continuación estudiamos el comportamiento según los diferentes rangos de edad. En el grupo de DV cortical más de un tercio de los pacientes se encuentran entre los 76 y 80 años de edad. Sin embargo, en el grupo de DV subcortical el mayor número de pacientes se encuentra entre los 81 y 85 años de edad. (Tabla 15) (Figura 23)

Tabla 15: Frecuencias absolutas y relativas según los grupos de edad según el tipo de DV							
	AÑOS N (%)						
	≤ 65	66-70	71-75	76-80	81-85	86-90	≥ 90
<b>DV CORTICAL (n= 99)</b>	3 (3 %)	7 (7 %)	15 (15,2%)	35 (35,4%)	19 (19,2%)	19 (19,2%)	1 (1%)
<b>DV SUBCORTICAL (n=101)</b>	5 (5%)	5 (5%)	15 (14,9%)	25 (24,8%)	31 (30,7%)	18 (17,8%)	2 (2%)



**Figura 23:** Distribución por edad según el subtipo de demencia vascular

Dentro de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, la edad media entre los pacientes de rápida progresión fue de 79,4 años ( $\pm 7,5$ ), mientras que la edad media entre los de progresión normal es de 79,7 años ( $\pm 6,6$ ). Las diferencias encontradas entre el grupo de progresión normal y el grupo control fueron estadísticamente significativas ( $p=0,044$ ).

### 2.3: NIVEL EDUCATIVO

Para el estudio del nivel educativo se establecieron 4 variables en función de la edad en la que el sujeto hubiera abandonado los estudios. En general, los sujetos del estudio presentaron un nivel educativo medio-bajo.

Dentro del grupo control el 44,3% de los pacientes sabían leer y escribir pero no habían completado sus estudios. Este porcentaje es del 48% en los pacientes con Demencia Vasculare y de 51,5% en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer. (Tabla 16). Las diferencias encontradas entre del grupo de Demencia Vasculare y el grupo control fueron estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ )

**Tabla 16:** Distribución del nivel de escolaridad en la muestra

	<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N (%)</b>	<b>DEMENCIA VASCULAR N (%)</b>	<b>CONTROLES N (%)</b>
<b>≤ 8 años</b>	34 (17%)	49 (24,5%)	19 (9,5%)
<b>8-13 años</b>	69 (34,5%)	47 (23,5%)	70 (34,8%)
<b>Estudios elementales</b>	84 (42%)	88 (44%)	99 (49,3%)
<b>Educación secundaria/Universidad</b>	13 (6,5%)	16 (8%)	13 (6,5%)

Dentro del grupo de Demencia Vascul ar, no habían finalizado los estudios primarios el 47,5% de los pacientes con DV cortical y el 48,5% de los pacientes con DV subcortical. (Tabla 17) Se establecieron diferencias estadísticamente significativas en escolaridad entre los grupos de DV cortical y DV subcortical frente a los controles ( $p=0,023$  y  $p=0,0001$ , respectivamente).

**Tabla 17:** Distribución del nivel de instrucción según el subtipo de DV

	<b>DV CORTICAL N (%)</b>	<b>DV SUBCORTICAL N (%)</b>
<b>≤ 8 años</b>	21 (21,2%)	28 (27,7%)
<b>8-13 años</b>	26 (26,3%)	21 (20,8%)
<b>Estudios elementales</b>	43 (43,4%)	45 (44,6%)
<b>Educación secundaria/Universidad</b>	9 (9,1%)	7 (6,9%)

Dentro del grupo de Enfermedad de Alzheimer, no se establecieron diferencias estadísticamente significativas en escolaridad en la comparativa general o por subgrupos de progresión rápida o normal con respecto al grupo control. No habían finalizado los estudios primarios el 57,2% de los pacientes con una rápida progresión y el 50,3% de los pacientes con una progresión normal. (Tabla 18)

**Tabla 18:** Distribución del nivel de instrucción según la progresión de Enfermedad de Alzheimer

	<b>EA RÁPIDA PROGRESIÓN N (%)</b>	<b>EA PROGRESIÓN NORMAL N (%)</b>
<b>≤ 8 años</b>	8 (22,9%)	26 (15,8%)
<b>8-13 años</b>	12 (34,3%)	57 (34,5%)
<b>Estudios elementales</b>	11 (31,4 %)	73 (44,2%)
<b>Educación secundaria/Universidad</b>	4 (11,4%)	9 (5,5%)

## 2.4: FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

El análisis de los factores de riesgo cardiovascular de los tres grupos se puede ver resumido en la tabla 19 y en la figura 24.

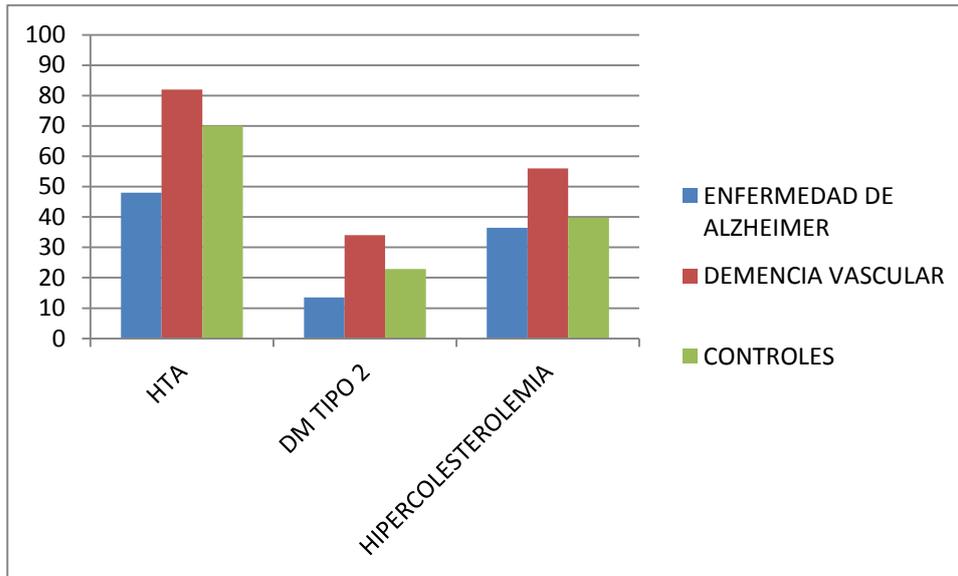
Dentro del grupo de Enfermedad de Alzheimer, 96 pacientes (48%) tenían antecedente de hipertensión arterial (HTA), 27 pacientes (13,5%) de diabetes mellitus tipo 2 (DM) y 73 pacientes (36,5%) tenían hipercolesterolemia.

En grupo de Demencia Vascular 164 pacientes (82%) tenían antecedentes de HTA, 68 pacientes (34%) de DM y 112 pacientes (56%) de hipercolesterolemia.

En el grupo control 141 pacientes (70,1%) tenían antecedentes de HTA, 46 pacientes (22,9%) de DM y 80 pacientes (39,8%) de hipercolesterolemia.

**Tabla 19:** Distribución de los factores de riesgo vascular según la muestra del estudio

		<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N (%)</b>	<b>DEMENCIA VASCULAR N (%)</b>	<b>CONTROLES N (%)</b>
<b>HTA</b>	<b>SI</b>	96 (48%)	164 (82%)	141 (70,1%)
	<b>NO</b>	104 (52%)	36 (18%)	60 (29,9%)
<b>DM</b>	<b>SI</b>	27 (13,5%)	68 (34%)	46 (22,9%)
	<b>NO</b>	173 (86,5%)	132 (66%)	155 (77,1%)
<b>HIPERCOLESTEROLEMIA</b>	<b>SI</b>	73 (36,5%)	112 (56%)	80 (39,8%)
	<b>NO</b>	127 (63,5%)	88 (44%)	121 (60,2%)



**Figura 24:** Porcentajes de los diferentes factores de riesgo vascular en la muestra

La presencia de factores de riesgo fue significativamente mayor en el grupo de Demencia Vascular. Existe una mayor frecuencia de antecedentes de HTA ( $p=0,005$ ), DM ( $p=0,014$ ) e hipercolesterolemia ( $p=0,001$ ) en pacientes con demencia vascular al compararlos con los controles. En cambio, se observó una mayor prevalencia de HTA ( $p=0,0001$ ) y DM ( $p=0,015$ ) en los controles frente a los sujetos con EA, no objetivándose diferencias estadísticamente significativas en lo referente a la dislipemia.

Cuando se compararon los diferentes factores de riesgo según el subtipo de Demencia Vascular, se observó que dentro de grupo de las DV cortical 77 pacientes (77,8%) tenían antecedentes de HTA, 37 pacientes (37,4%) de DM y 50 pacientes de hipercolesterolemia (50,5%).

En grupo de DV subcortical, 87 pacientes tenían antecedentes de HTA (86,1%), 31 pacientes de DM (30,7%) y 62 pacientes de hipercolesterolemia (61,4%).

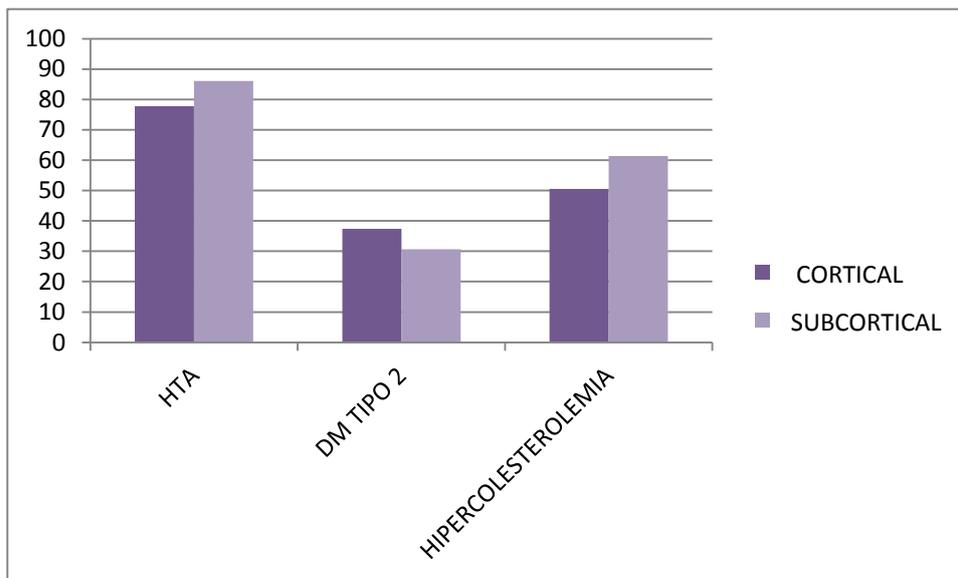
Se encontró un mayor número de pacientes con HTA en el grupo de DV subcortical frente al grupo control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,002$ ). También fue estadísticamente significativa la diferencia observada entre estos dos grupos con respecto al grupo control en la hipercolesterolemia ( $p=0,0001$ ). En cambio, la DM prevaleció en el grupo con DV cortical frente a los controles, obteniéndose diferencias significativas entre ambos grupos ( $p=0,008$ ). Las diferencias no alcanzaron significación estadística en la comparativa

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

entre DV cortical y controles en cuanto a HTA e hipercolesterolemia , ni en la comparativa entre DV subcortical y controles al analizar la presencia de DM (P=0,142). Los resultados se pueden observar resumidos en la tabla 20 y figura 25.

**Tabla 20:** Distribución de los factores de riesgo vascular según el subtipo de DV

		DV CORTICAL N (%)	DV SUBCORTICAL N (%)
HTA	SI	77 (77,8%)	87 (86,1%)
	NO	22 (22,2%)	14 (13,9%)
DM	SI	37 (37,4%)	31 (30,7%)
	NO	62 (62,6%)	70 (69,3%)
HIPERCOLESTEROLEMIA	SI	50 (50,5%)	62 (61,4%)
	NO	47 (47,5%)	36 (38,6%)



**Figura 25:** Porcentaje de los diferentes factores de riesgo vascular según subtipo de DV

Cuando se compararon los diferentes factores de riesgo según la progresión de la Enfermedad de Alzheimer, se observó que dentro del grupo de rápida progresión 15 pacientes (42,9%) presentaban antecedente de HTA, 5 pacientes (14,3%) de DM y 13 pacientes (37,1%) de hipercolesterolemia.

En el grupo de progresión normal, 81 pacientes (49,1%) presentaban antecedente de HTA, 22 pacientes (13,3%) de DM y 60 pacientes (36,4%) de hipercolesterolemia.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Los factores de riesgo vascular fueron menos numerosos en ambos grupos de progresión de Enfermedad de Alzheimer frente a los controles. A pesar de ello, sólo la HTA en aquellos con rápida progresión ( $p=0,002$ ) y la HTA y la DM en individuos con EA de progresión normal ( $p=0,0001$  y  $p=0,019$ , respectivamente) mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.

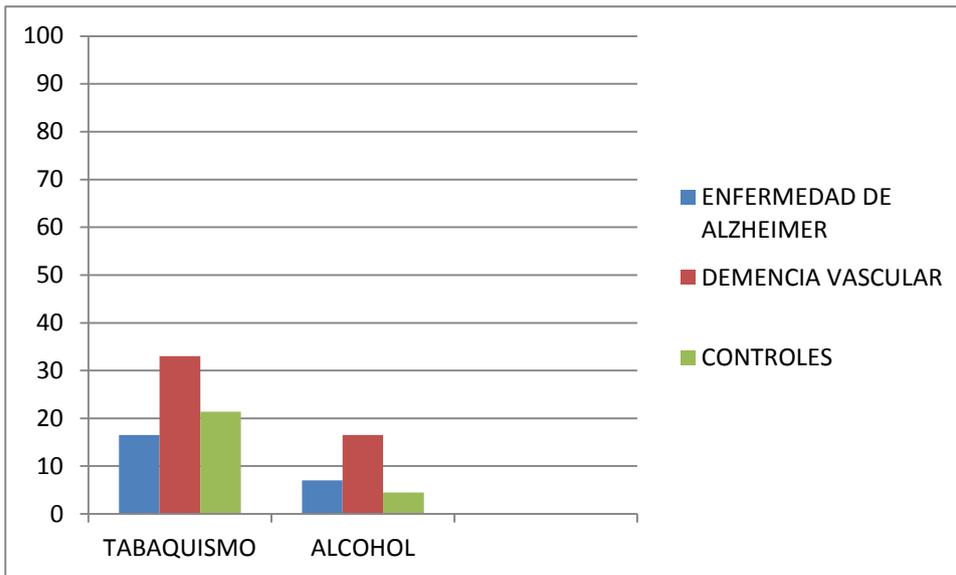
### 2.5 HÁBITOS TÓXICOS:

En referencia a los hábitos tóxicos, se estudiaron el hábito tabáquico y el enolismo. Los resultados obtenidos mostraron un mayor consumo de tabaco entre los pacientes con Demencia Vascular (33%) con respecto al grupo control (21,4%) y al de Enfermedad de Alzheimer (16,5%). Esta asociación es estadísticamente significativa ( $p=0,009$ ). (Tabla 21) (Figura 26)

Respecto al abuso de alcohol, los resultados obtenidos mostraron un consumo de alcohol de casi el doble entre los pacientes con Demencia Vascular (16,4%), respecto a los pacientes con Enfermedad de Alzheimer (7%) y de casi el triple respecto al grupo control (4,5%) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ). (Tabla 21) (Figura 28)

**Tabla 21:** Distribución de los hábitos tóxicos en los grupos de estudio

		ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N (%)	DEMENCIA VASCULAR N (%)	CONTROLES N (%)
TABAQUISMO	SI	33 (16,5%)	66 (33%)	43 (21,4%)
	NO	167 (83,5%)	134 (67%)	158 (78,6%)
CONSUMO DE ALCOHOL	SI	14 (7%)	33 (16,5%)	8 (4,5%)
	NO	186 (93%)	167 (83,5 %)	192 (95,5%)



**Figura 26:** Porcentaje de hábitos tóxicos en los grupos de estudio

Respecto a los hábitos tóxicos por subtipos de Demencia Vasculat, en la comparativa entre el grupo de DV cortical en cuanto al consumo de tabaco (34,3%) y alcohol (18,2%) frente al grupo control se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,016$  y  $p=0,0001$ , respectivamente). Este hecho también se observó en la comparativa entre el grupo de DV subcortical y el grupo control con respecto al consumo de alcohol (14,9%,  $p=0,002$ ), no llegándose a alcanzar la significación en el caso del tabaquismo.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar tabaquismo y consumo de alcohol en el grupo de progresión rápida y progresión normal de Enfermedad de Alzheimer con respecto al grupo control.

### **3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON DEMENCIA**

#### **3.1 EVALUACIÓN DE LA DEMENCIA**

Para la evaluación de la demencia del paciente se recogieron múltiples variables de las cuales resumimos en los siguientes párrafos.

Respecto al tiempo de evolución medio, en el caso de la Demencia Vasculat fue de 3,94 años ( $DE = 2,496$  años), con un intervalo que se sitúa entre 1 y 13.

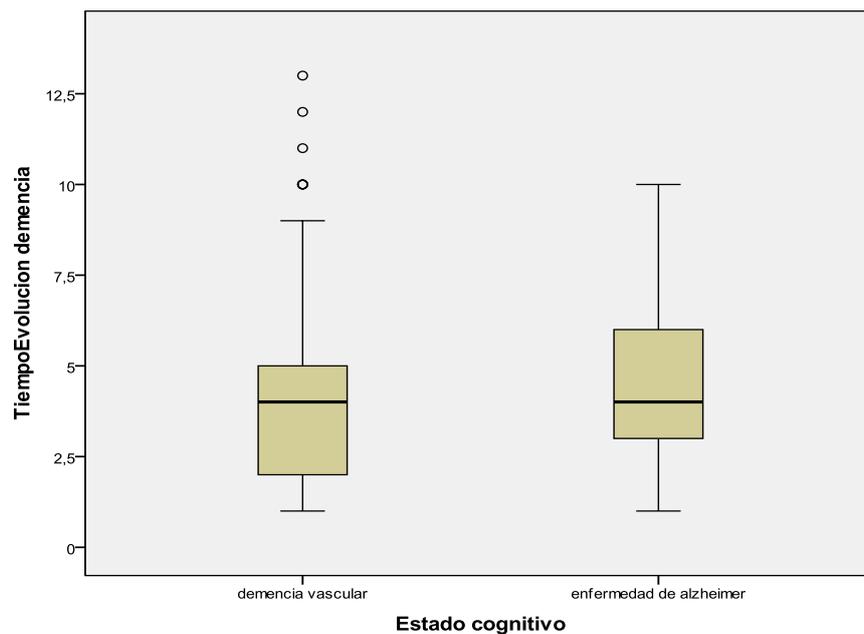
En el caso del tiempo de evolución de la Enfermedad de Alzheimer, el tiempo medio fue de 4,30 años ( $DE= 2,180$  años), con un intervalo que se sitúa entre 1 y 10 años. (Tabla 22) (Figura 27).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Las diferencias observadas entre los tiempos de evolución de ambas demencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,126$ ).

**Tabla 22:** Tiempo de evolución de la demencia según grupo Demencia Vascolar o Enfermedad de Alzheimer

	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE)	ERROR TÍPICO	IC 95%		Max.	Min.
					Lim. Inf.	Lim. Sup.		
<b>Demencia Vascolar</b>	200	3,94	2,496	0,177	3,59	4,28	1	13
<b>Enfermedad de Alzheimer</b>	200	4,30	2,184	0,154	3,99	4,60	1	10



**Figura 27:** Comparación del tiempo de evolución de la demencia entre Demencia Vascolar y Enfermedad de Alzheimer.

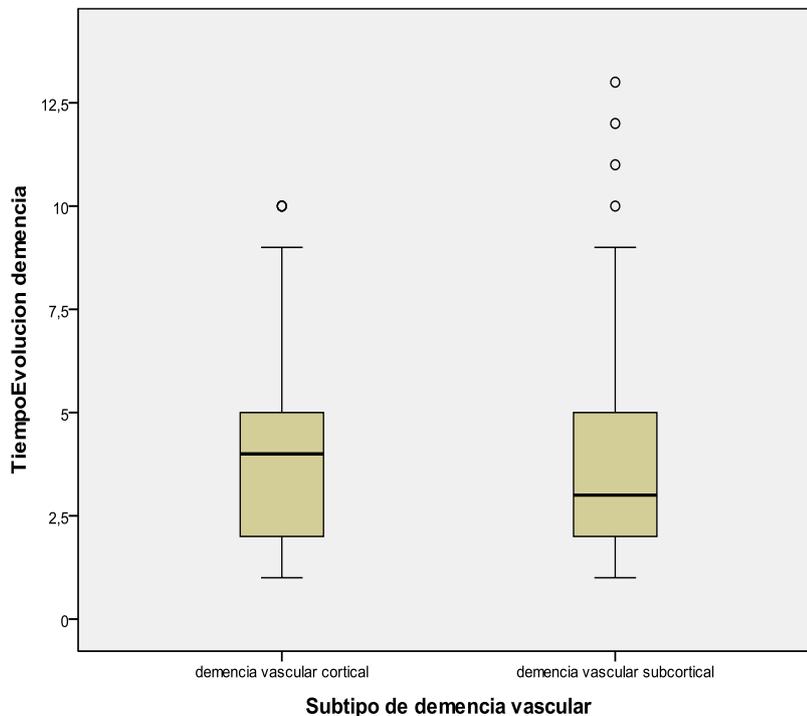
Por otro lado, el tiempo medio de evolución en el grupo de Demencia Vascolar, fue en el grupo de DV cortical de 3,96 años (DE= 2,457 años), con un intervalo que se sitúa entre 1 y 10 años. En el grupo de DV subcortical el tiempo medio fue de 3,91 años (DE= 2,546), con un intervalo que se sitúa entre 1 y 13 años. (Tabla 23) (Figura 28).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Las diferencias observadas entre los subgrupos de DV no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,891$ ).

**Tabla 23:** Tiempo de evolución de la demencia según subgrupo de DV

	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (DE)	ERROR TÍPICO	IC 95%		Max.	Min.
					Lim. Inf.	Lim. Sup.		
<b>DV cortical</b>	99	3,96	2,457	0,247	3,47	4,45	1	10
<b>DV subcortical</b>	101	3,91	2,546	0,253	3,41	4,41	1	13



**Figura 28:** Comparación del tiempo de evolución entre los diferentes subgrupos de DV

Para evaluar la severidad de la demencia empleamos la escala *Clinical Dementia Rating* (CDR) de Hughes.

Dentro del grupo de Demencia Vasculare, un 39% de los pacientes presentaron un grado de demencia leve, un 40,5% un grado moderado y un 20,5% un grado grave.

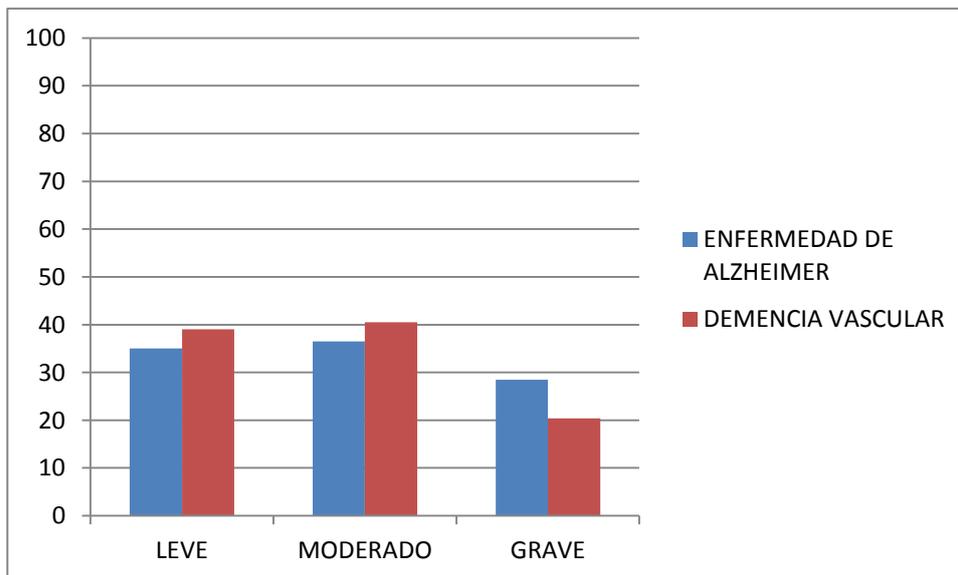
En la Enfermedad de Alzheimer un 35% de los pacientes presentaron un grado de demencia leve, un 36,5% moderado y un 28,5% grave.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la severidad de la demencia entre ambos grupos ( $p=0,177$ ). Los resultados obtenidos pueden observarse en la tabla 24 y en la figura 29.

**Tabla 24:** Estadio evolutivo de a demencia según grupo de Demencia Vascolar o Enfermedad de Alzheimer

		ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N(%)	DEMENCIA VASCULAR N(%)
ESTADIO CDR	LEVE	70 (35%)	78 (39%)
	MODERADO	73 (36,5%)	81 (40,5%)
	GRAVE	57 (28,5%)	41 (20,4%)



**Figura 29:** Estadio evolutivo de demencia según el tipo de demencia

El estudio de la variable CDR por subtipos de Demencia Vascolar determinó que dentro del subgrupo DV cortical un 29,3% presentaban un grado leve, un 44,4% un grado moderado y un 26,3% un grado grave.

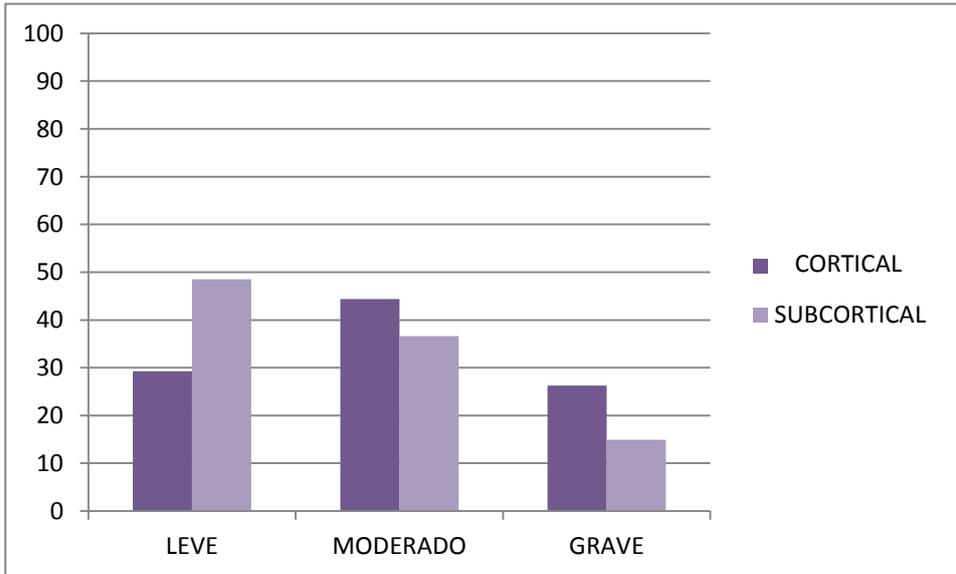
En el subgrupo de DV subcortical un 48,5% presentaban un grado de demencia leve, un 36,6% un grado moderado y un 14,9% un grado grave. (Tabla 25) (Figura 30).

Las diferencias observadas entre los subgrupos de demencia vascular fueron estadísticamente significativas ( $p= 0,013$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 25:** Estadio evolutivo de demencia según el subgrupo de Demencia Vascolar

ESTADIO CDR		DV CORTICAL	DV SUBCORTICAL
		N(%)	N(%)
	<b>LEVE</b>	29 (29,3%)	49 (48,5%)
	<b>MODERADO</b>	44 (44,4%)	37 (36,6%)
	<b>GRAVE</b>	26 (26,3%)	15 (14,9%)



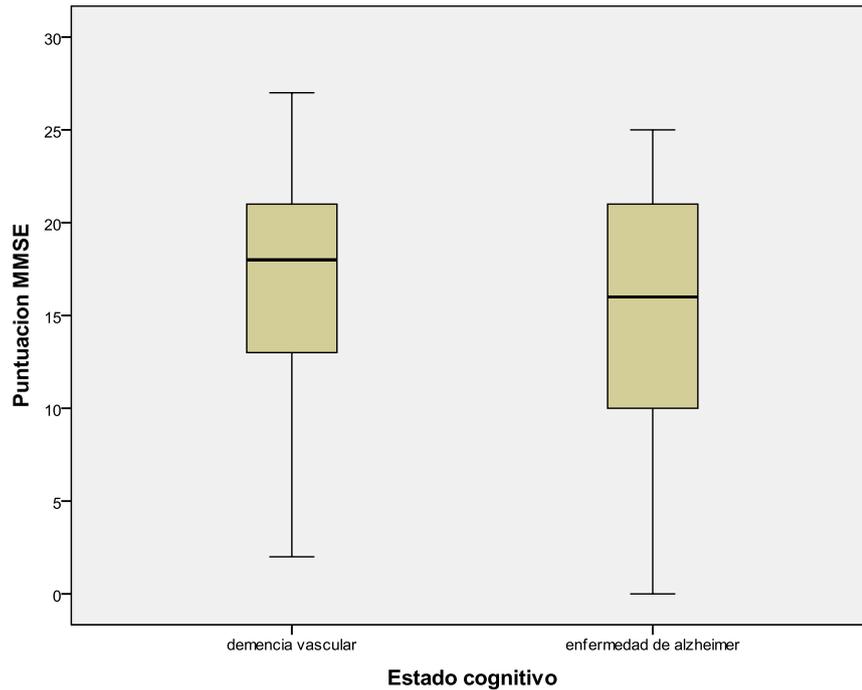
**Figura 30:** Estadio evolutivo según subgrupo de DV

El análisis descriptivo según del rendimiento cognitivo se realizó a través del *Mini Mental State Examination* (MMSE). La puntuación media en el grupo de Demencia Vascolar fue de 16,40 puntos (DE= 6,203). Por otro lado, la puntuación media en el grupo de Enfermedad de Alzheimer fue de 14,99 puntos (DE= 6,434). (Tabla 26) (Figura 31).

Las diferencias observadas en el rendimiento cognitivo en ambos grupos fue estadísticamente significativa ( $p=0,026$ ).

**Tabla 26:** MMSE según el tipo de demencia

	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	ERROR TÍPICO	IC 95%		Max.	Min.
					Lim inf.	Lim Sup.		
<b>Demencia Vascolar</b>	200	16,40	±6,203	0,439	15,54	17,26	2	27
<b>Enfermedad de Alzheimer</b>	200	14,99	±6,434	0,455	14,09	15,88	0	25

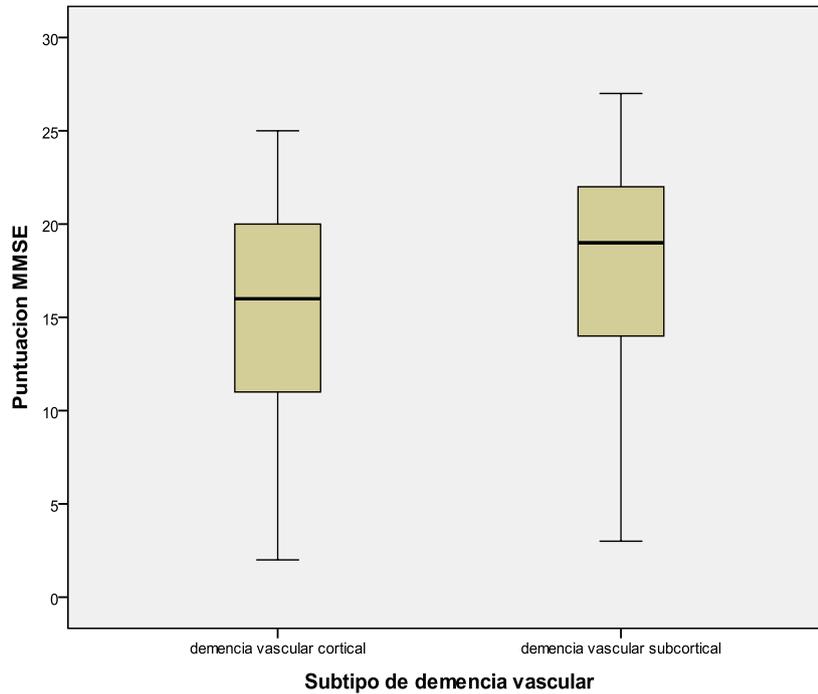


**Figura 31:** Comparación en la puntuación MMSE según el tipo de demencia

Si analizamos el rendimiento cognitivo en el grupo de Demencia Vascolar observamos que el subgrupo de DV cortical presentó una puntuación media de 15,23 puntos (DE= 6,151), mientras que el subgrupo DV subcortical presentó un puntuación de 17,54 puntos (DE=6,067). (Tabla 27) (Figura 32)

Las diferencias observadas entre ambos subgrupos de DV fueron estadísticamente significativas ( $p=008$ ).

Tabla 27: Puntuación MMSE según subtipo de Demencia Vascolar								
	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO	IC 95%		Max.	Min.
					Lim. Inf.	Lim. Sup.		
<b>DV cortical</b>	99	15,23	6,151	0,618	14,01	16,46	2	25
<b>DV subcortical</b>	101	17,54	6,067	0,604	16,35	18,74	3	27



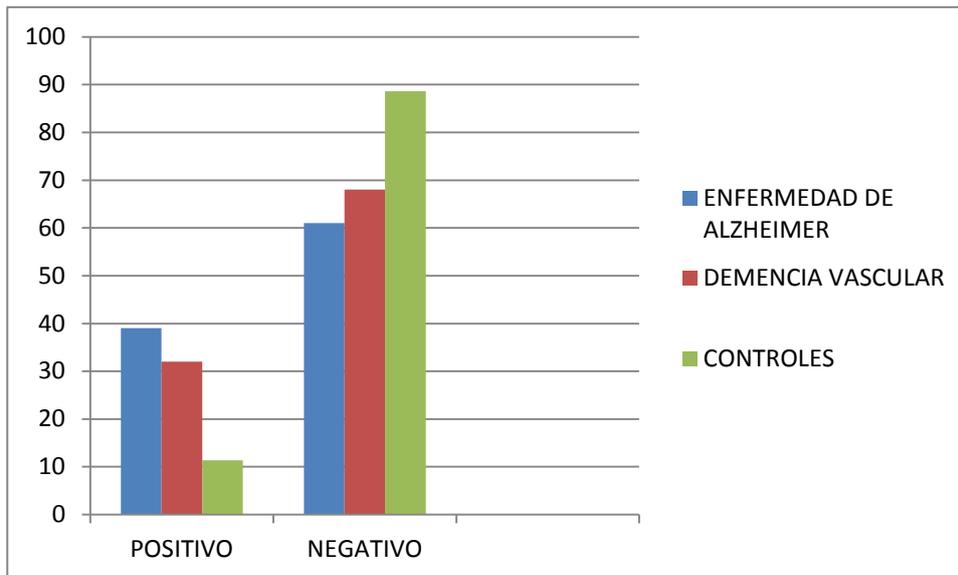
**Figura 32:** Comparación en la puntuación MMSE según el subtipo de DV

### 3.2 POLIMORFISMO APOE

Se realizó el análisis estadístico en función de la positividad o negatividad para el alelo APOE ε4. Se consideraron positivos tanto los homocigotos como los heterocigotos para la APOE ε4. En el grupo de Enfermedad de Alzheimer el 39% de los pacientes eran portadores del alelo APOE ε4, en el grupo de Demencia Vascolar un 32%, y en el grupo control el 11,4%. Las diferencias observadas entre los pacientes con Enfermedad de Alzheimer y Demencia Vascolar frente a los controles fueron estadísticamente significativas ( $p= 0,0001$ ). (tabla 28) (Figura 33)

**Tabla 28:** Clasificación según APOE de la muestra

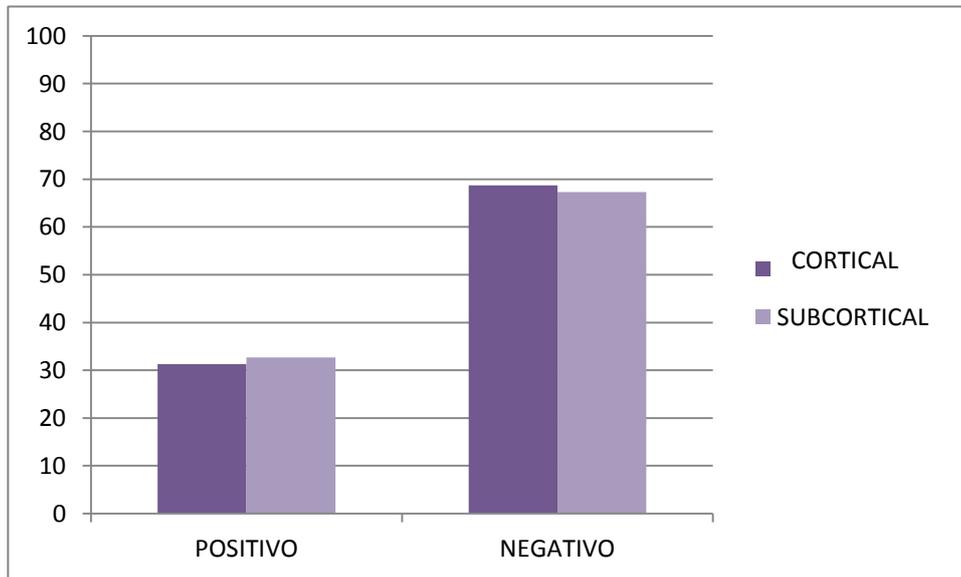
		ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N(%)	DEMENCIA VASCULAR N(%)	CONTROL N(%)
APOE ε4	POSITIVO	78 (39%)	64 (32%)	23 (11,4%)
	NEGATIVO	122 (61%)	136 (68%)	178 (88,6%)



**Figura 33:** Porcentaje de APOE4 en la muestra

También se analizó la presencia del alelo APOE  $\epsilon$ 4 según el subtipo de Demencia Vascular, comprobándose una distribución similar entre ambos subgrupos ya que se observó que la APOE4 fue positiva en el 31,3% de los pacientes con DV cortical, respecto al 32,7% de los pacientes con DV tipo subcortical. Dentro del subgrupo de DV cortical, se determinó que las diferencias en cuanto a portadores del alelo APOE  $\epsilon$ 4 entre este subgrupo y el de control eran estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ). Esto también sucedía en la comparativa entre el grupo de DV subcortical y los controles ( $p= 0,0001$ ) (Tabla 29) (Figura 34)

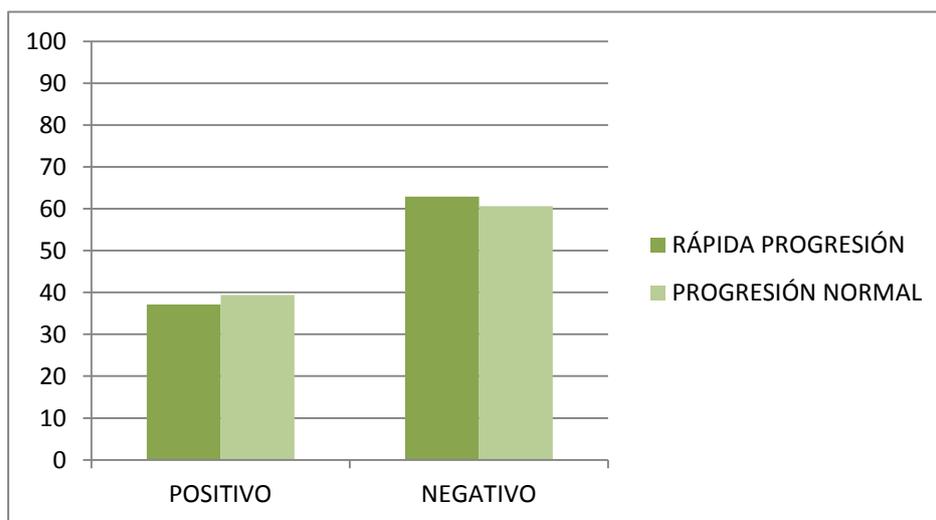
Tabla 29: Clasificación de la APOE según el subtipo de DV			
		DV CORTICAL N(%)	DV SUBCORTICAL N(%)
<b>APOE <math>\epsilon</math>4</b>	<b>POSITIVO</b>	31 (31,3%)	33 (32,7%)
	<b>NEGATIVO</b>	68 (68,7%)	68 (67,3%)



**Figura 34:** Distribución de APOE4 según el subtipo de DV.

Respecto a la presencia del alelo APOE  $\epsilon$ 4 en el grupo de Enfermedad de Alzheimer, también se observó una distribución homogénea con independencia de la velocidad de progresión de la enfermedad. Así, un 37,1% de los pacientes con rápida progresión eran portadores del alelo APOE  $\epsilon$ 4, frente al 39,4% de los pacientes del grupo de progresión normal, encontrándose diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos con el grupo control ( $p=0,0001$ ). (Tabla 30) (Figura 35)

<b>Tabla 30:</b> Clasificación de la APOE según el subtipo de EA			
		<b>EA RÁPIDA PROGRESIÓN N(%)</b>	<b>ES PROGRESIÓN NORMAL N(%)</b>
<b>APOE <math>\epsilon</math>4</b>	<b>POSITIVO</b>	13 (37,1%)	65 (39,4%)
	<b>NEGATIVO</b>	22 (62,9%)	100 (60,6%)



**Figura 35:** Distribución de APOE4 según ritmo de progresión de EA

#### **4. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES GENÉTICAS**

Tras observar la existencia de diferencias entre los diferentes grupos de estudio, se determinó la representatividad de la muestra respecto de la población general a través del equilibrio de Hardy-Weinberg. Una vez confirmada la representatividad se analizó la posible relación entre polimorfismos relacionados con la reparación de DNA, autofagia y el polimorfismo Met129Val del gen *PrPN* y la Enfermedad de Alzheimer y la Demencia Vasculare. Para ello se llevó a cabo un estudio comparativo entre un grupo control y un grupo de sujetos con Enfermedad de Alzheimer y otro con Demencia Vasculare perteneciente a las áreas sanitarias de Ávila y Salamanca. A continuación, se exponen los resultados obtenidos para cada polimorfismo.

##### **4.1 GENES REPARADORES DE DNA**

Se estudiaron tres polimorfismos relacionados con la reparación de DNA: Arg399Gln de *XRCC1*, Lys751Gln de *ERCC2* y Thr241Met de *XRCC3*. Las funciones de cada uno de estos polimorfismos se detallan en el capítulo 1. Los resultados observados para cada polimorfismo se presentan a continuación de forma individualizada.

##### **4.1.1: ESTUDIO COMPARATIVO DEL POLIMORFISMO Arg399Gln DEL GEN *XRCC1* ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES**

Respecto al gen *XRCC1*, se estudió el polimorfismo Arg399Gln, localizado en el exón 10, en el dominio BRCT-1. Consiste en el cambio de Guanina (G) por Adenosina (A) en la secuencia del

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

DNA, lo que una vez transcrito supone la sustitución de Arginina (Arg) por Glutamina (Gln) en la región BRCT-1.

En la tabla 31 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* en los 200 casos con Enfermedad de Alzheimer y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Arg399Gln del gen *XRCC1* entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,345$ ).

**Tabla 31:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Enfermedad de Alzheimer y controles relacionados con el polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95%	P
Codominante	Arg/Arg	83 (41,3%)	87(43,5%)	1		
	Arg/Gln	97(48,3%)	84 (42%)	0,69	(0,44-1,10)	0,122
	Gln/Gln	21 (10,4%)	29 (14,5%)	1,34	(0,68-2,64)	0,402
Dominante	Arg/Arg	83 (41,3%)	87(43,5%)	1		
	Arg/Gln+Gln/Gln	118 (58,7%)	113 (56,5%)	0,81	(0,53-1,25)	0,341
Recesivo	Gln/Gln	21 (10,4%)	29 (14,5%)	1		
	Arg/Arg+Arg/Gln	180 (89,6%)	171(85,5%)	0,63	(0,33-1,20)	0,153

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE en la distribución genotípica del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1*.

El análisis de los genotipos en función de la edad no mostró diferencias significativas entre controles y pacientes con Alzheimer mayores de 80 años, ni en el grupo con edad igual o inferior a 80 años en el polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* estudiado ( $p>0,05$ ) [ver Anexo VII, Tabla 1]

En la tabla 32 se analizan los modelos de herencia (dominante, codominante y recesivo) según si los pacientes eran portadores o no del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE. Con independencia del estado de portador o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ , se mantuvo la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Arg399Gln del gen *XRCC1* en la comparativa entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y controles para los tres modelos ( $p> 0,05$ )

**Tabla 32:** Distribución del gen *XRCC1* entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 78</b>			
Arg/Arg	6 (26,1%)	33 (42,3%)	1		
Arg/Gln	15 (65,2%)	34 (46,6%)	0,55	(0,18-1,71)	0,302
Gln/Gln	2 (8,7%)	11 (14,1%)	1,42	(0,23-8,60)	0,702
Dominante			0,66	(0,22-1,98)	0,458
Recesivo			0,47	(0,09-2,41)	0,368
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 122</b>			
Arg/Arg	77 (43,3%)	54 (44,3%)	1		
Arg/Gln	82 (46,1%)	50 (41%)	0,75	(0,45-1,25)	0,274
Gln/Gln	19 (10,7%)	18 (14,8%)	1,33	(0,63-2,80)	0,454
Dominante			0,86	(0,53-1,39)	0,545
Recesivo			0,66	(0,33-1,33)	0,246

#### 4.1.2: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Lys751Gln DEL GEN *ERCC2* ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES

Del gen reparador de DNA *ERCC2* se estudió el polimorfismo Lys751Gln que consiste en un cambio de Adenosina (A) por Citosina (C) en la secuencia del DNA, lo que una vez transcrito produce un cambio de Lisina (Lys) por Glutamina (Gln) en el codón 751 que introduce un cambio conformacional en el extremo carboxiterminal de la proteína.

En la tabla 33 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Lys751Gln en los 200 casos con Enfermedad de Alzheimer y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Lys751Gln entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,096$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 33:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Enfermedad de Alzheimer y controles relacionados con el polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2*

Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95%	p
<b>Codominante</b>	Lys/Lys	92 (45,8%)	90 (45%)	1		
	Lys/Gln	80(39,8%)	88 (44%)	1,10	(0,70-1,73)	0,673
	Gln/Gln	29 (14,4%)	22 (11%)	0,72	(0,36-1,42)	0,343
<b>Dominante</b>	Lys/Lys	92 (45,8%)	90 (45%)	1		
	Lys/Gln+Gln/Gln	109 (54,2%)	110 (55%)	1	(0,65-1,53)	0,999
<b>Recesivo</b>	Gln/Gln	29 (14,4%)	22 (11%)	1		
	Lys/Lys+Lys/Gln	172 (85,6%)	178(89%)	1,46	(0,76-2,78)	0,253

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como de APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2*.

El análisis de los genotipos en función de la edad no muestra diferencias significativas entre controles y pacientes con Enfermedad de Alzheimer con edad menor o igual a 80 años, ni en el grupo con edad mayor a 80 años en el polimorfismo del gen *ERCC2* estudiado, ya que aunque se observa una tendencia de mayor riesgo de Enfermedad de Alzheimer en aquellos portadores del genotipo Lys/Lys+Lys/Gln en el modelo recesivo en el grupo de mayor edad, ésta no alcanza grado de significación estadística ( $p > 0,05$ ). [Ver Anexo VII, Tabla 2].

En la tabla 34 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ . En ambos grupos, portadores y no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Lys751Gln entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y controles para ninguno de los tres modelos ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 34:** Distribución del gen *ERCC2* entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 78</b>			
Lys/Lys	12 (52,2%)	34 (43,6%)	1		
Lys/Gln	6 (26,1%)	35 (44,9%)	1,82	(0,59-5,65)	0,298
Gln/Gln	5 (21,7%)	9 (11,5%)	0,81	(0,21-3,06)	0,754
Dominante			1,43	(0,54-3,78)	0,472
Recesivo			1,57	(0,44-5,58)	0,488
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 122</b>			
Lys/Lys	80 (44,9%)	56 (45,9%)	1		
Lys/Gln	74 (41,6%)	53 (43,4%)	0,98	(0,59-1,62)	0,946
Gln/Gln	24 (13,5%)	13 (10,7%)	0,71	(0,32-1,54)	0,382
Dominante			0,91	(0,57-1,47)	0,712
Recesivo			1,40	(0,67-2,93)	0,368

### 4.1.3: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Thr241Met DEL GEN *XRCC3* ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES

Respecto al gen *XRCC3* se estudió el polimorfismo Thr241Met, que produce una sustitución de Citosina (C) por Timina (T) en la posición 18067 (exón 7) de *XRCC3*, que se traduce en el cambio de Threonina (Thr) por Metionina (Met) en el codón 241. Este cambio elimina un sitio de fosforilación de la proteína, impidiendo la interacción de *XRCC3* con otros elementos de la vía DSB y alterando la capacidad de reparación celular.

En la tabla 35 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Thr241Met en los 200 casos con Enfermedad de Alzheimer y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Thr241Met entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,995$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 35:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Enfermedad de Alzheimer y controles relacionados con el polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3*

Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95%	P
<b>Codominante</b>	Thr/Thr	125 (62,2%)	117(58,5%)	1		
	Met/Thr	67(33,3%)	68 (34%)	1,17	(0,75-1,85)	0,486
	Met/Met	9 (4,5%)	15 (7,5%)	1,54	(0,60-3,93)	0,364
<b>Dominante</b>	Thr/Thr	125 (62,2%)	117(58,5%)	1		
	Thr/Met+Met/Met	76 (37,8%)	83 (41,5%)	1,22	(0,79-1,88)	0,362
<b>Recesivo</b>	Met/Met	9 (4,5%)	15 (7,5%)	1		
	Met/Thr+Thr/Thr	192 (95,5%)	185(92,5%)	0,69	(0,27-1,73)	0,425

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE en la distribución genotípica del polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3*.

El análisis de los genotipos en función de la edad no muestra diferencias significativas entre controles y pacientes con Enfermedad de Alzheimer para el polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3*, pues aunque en el grupo de individuos con edad menor o igual a 80 años se objetiva una tendencia a mayor riesgo de EA en los portadores del genotipo Thr/Met+Met/Met en el modelo dominante, ésta no alcanza grado de significación estadística ( $p>0,05$ ). [Ver Anexo VII, Tabla 3].

En la tabla 36 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ . El análisis de los genotipos de Thr241Met en función del estado de portador o no del alelo APOE  $\epsilon 4$  no mostró diferencias significativas entre controles y pacientes con Enfermedad de Alzheimer para ninguno de los tres modelos ( $p>0,05$ ).

**Tabla 36:** Distribución del gen *XRCC3* entre portadores y no portadores de APOE4

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE 4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 78</b>			
Thr/Thr	15 (65,2%)	46 (59%)	1		
Met/Thr	7 (30,4%)	24 (30,8%)	1,99	(0,34-2,88)	0,980
Met/Met	1 (4,3%)	8 (10,3%)	2,09	(0,22-19,90)	0,520
Dominante			1,13	(0,41-3,11)	0,817
Recesivo			0,47	(0,05-4,38)	0,511
<b>APOE 4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 122</b>			
Thr/Thr	110 (61,8%)	71 (58,2%)	1		
Met/Thr	60 (33,7%)	44 (36,1%)	1,19	(0,72-1,97)	0,492
Met/Met	8 (4,5%)	7 (5,7%)	1,38	(0,47-4,09)	0,556
Dominante			1,22	(0,75-1,97)	0,427
Recesivo			0,77	(0,26-2,24)	0,632

### 4.1.4 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE GENES REPARADORES DEL DNA Y PROGRESIÓN EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Por último, se determinó la influencia de los genes estudiados en la progresión rápida o normal de la Enfermedad de Alzheimer mediante dos métodos:

- 1) Se analizó la distribución genotípica de los polimorfismos de genes reparadores estudiados según la progresión rápida o normal de la Enfermedad de Alzheimer así como la influencia del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE en dicha distribución.
- 2) Se evaluó el papel de cada polimorfismo en la tasa de variación del MMSE (disminución en la puntuación del MMSE/tiempo de seguimiento expresado en años) mediante el uso de un modelo lineal general, donde los efectos del genotipo sobre los fenotipos de progresión de la enfermedad se calcularon mediante un análisis de regresión logística, tras ajustar por factores clásicos que habitualmente afectan a la progresión de la enfermedad como la edad al diagnóstico, el sexo, el nivel educativo, la presencia de depresión y/o síntomas psicóticos, el tratamiento con cualquier inhibidor de la acetilcolinesterasa, memantina, o ambos y el tiempo de seguimiento (2).
- 3) Se definió como progresión rápida la disminución en puntuación MMSE  $\geq 4,5$  puntos al año.

En el caso de Arg399Gln del gen *XRCC1* un 17,2% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Arg/Arg presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 17,7% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Arg/Gln-Gln/Gln, siendo esta relación no estadísticamente significativa ( $p = 0,933$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Arg399Gln según el fenotipo de progresión rápida o normal de la Enfermedad de Alzheimer al analizar por separado a portadores y no portadores del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE (Tabla 37).

**Tabla 37.** Distribución del gen *XRCC1* según la progresión de Enfermedad de Alzheimer

		EA RAPIDA PROGRESION, N (%)	EA PROGRESION NORMAL, N (%)	P
<b>TOTAL</b>	Arg/Arg	15 (17,2%)	72 (82,7%)	0,933
	Arg/Gln-Gln/Gln	20 (17,7%)	93 (82,3%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	Arg/Arg	6 (18,2%)	27 (81,8%)	0,758
	Arg/Gln-Gln/Gln	7 (15,6%)	38 (84,4%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	Arg/Arg	9 (16,7%)	45 (83,3%)	0,727
	Arg/Gln-Gln/Gln	13 (19,25)	55 (80,8%)	

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Tampoco se encontró influencia significativa del gen *XRCC1* o de APOE sobre la velocidad de progresión de la Enfermedad de Alzheimer en el análisis de regresión logística ajustado por factores clásicos que habitualmente afectan a la progresión de esta enfermedad. El análisis de estas variables determinó que la presencia de síntomas psicóticos, el tratamiento con Anticolinesterásicos (IChE) o memantina así como el tiempo de seguimiento son factores que se relacionaron con una progresión más rápida de la enfermedad con  $p=0,009$ ,  $p=0,0001$  y  $p=0,0001$  respectivamente (Tabla 38).

Tabla 38: Análisis de regresión logística de diferentes variables independientes			
VARIABLE	OR	IC 95%	P
Edad al diagnóstico	1,01	0,95-1,08	0,730
Género	0,51	0,21-1,24	0,137
Educación	0,86	0,51-1,46	0,585
Depresión	0,88	0,36-2,15	0,780
Psicosis	3,34	1,36-8,20	<b>0,008</b>
IChE/memantina	3,18	1,88-5,39	<b>0,0001</b>
Tiempo de seguimiento	0,54	0,39-0,74	<b>0,0001</b>
Portador de APOE $\epsilon 4$	0,89	0,37-2,16	0,798
Genotipo Arg/Arg del gen <i>XRCC1</i>	1,19	0,49-2,90	0,694

En el caso del polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2*, un 18,9% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Lys/Lys presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 15,6% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Lys/Gln-Gln/Gln, siendo esta relación no estadísticamente significativa ( $p = 0,640$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos de portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$  (Tabla 39).

Tabla 39. Distribución del gen <i>ERCC2</i> según la progresión de Enfermedad de Alzheimer				
		EA RAPIDA PROGRESION, N (%)	EA PROGRESION NORMAL, N (%)	P
TOTAL	Lys/Lys	17 (18,9%)	73 (81,1%)	0,640
	Lys/Gln-Gln/Gln	18 (15,6%)	74 (80,4%)	
APOE $\epsilon 4$ (+)	Lys/Lys	7 (20,6%)	27 (79,4%)	0,414
	Lys/Gln-Gln/Gln	6 (13,6%)	38 (86,4%)	
APOE $\epsilon 4$ (-)	Lys/Lys	10 (17,9%)	46 (82,1%)	0,963
	Lys/Gln-Gln/Gln	12 (18,2%)	54 (81,8%)	

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Tampoco se demostró la influencia del gen *ERCC2* o APOE en la progresión rápida o normal de la Enfermedad de Alzheimer en el análisis de regresión logística, que confirmó –de modo similar al caso de *XRCC1*- que la presencia de psicosis, la toma de IChE o memantina y un menor tiempo de evolución constituían variables relacionadas con la velocidad de progresión de la Enfermedad de Alzheimer ( $p < 0,05$ ) (Tabla 40).

<b>Tabla 40: Análisis de regresión logística de diferentes variables independientes</b>			
<b>VARIABLE</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Edad al diagnóstico</b>	1,01	0,95-1,08	0,710
<b>Género</b>	0,53	0,22-1,26	0,150
<b>Educación</b>	0,86	0,51-1,45	0,570
<b>Depresión</b>	0,92	0,38-2,20	0,846
<b>Psicosis</b>	3,31	1,35-8,13	<b>0,009</b>
<b>IChE/memantina</b>	3,16	1,87-5,35	<b>0,0001</b>
<b>Tiempo de seguimiento</b>	0,54	0,39-0,74	<b>0,0001</b>
<b>Portador de APOE <math>\epsilon 4</math></b>	0,90	0,37-2,17	0,811
<b>Genotipo Lys/Lys del gen <i>ERCC2</i></b>	1,06	0,46-2,48	0,885

En el polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3*, se observó una tendencia a una progresión más rápida en los individuos con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Thr/Thr, al presentar un 21,4% de estos pacientes con una progresión rápida de la enfermedad frente al 12% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Thr/Met-Met/Met, no alcanzándose el grado de significación estadística ( $p = 0,087$ ).

Entre los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , un 22,5% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Thr/Thr presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 11,8% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Thr/Met-Met/Met, siendo esta relación no estadísticamente significativa ( $p = 0,127$ ).

Entre los portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , un 19,6% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Thr/Thr presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 12,5% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Thr/Met-Met/Met, siendo esta relación no estadísticamente significativa ( $p = 0,410$ ) (Tabla 41).

**Tabla 41.** Distribución del gen *XRCC3* según la progresión de Enfermedad de Alzheimer

		EA RAPIDA PROGRESION, N (%)	EA PROGRESION NORMAL, N (%)	P
<b>TOTAL</b>	Thr/Thr	25 (21,4%)	92 (78,6%)	0,087
	Thr/Met-Met/Met	10 (12,0%)	73 (88,0%)	
<b>APOE ε4 (+)</b>	Thr/Thr	9 (19,6%)	37 (80,4%)	0,127
	Thr/Met-Met/Met	4 (12,5%)	28 (87,5%)	
<b>APOE ε4 (-)</b>	Thr/Thr	16 (22,5%)	55 (77,5%)	0,410
	Thr/Met-Met/Met	6 (11,8%)	45 (88,2%)	

En el análisis de regresión logística, también se observó una tendencia a una progresión más rápida en los individuos con EA portadores del genotipo Thr/Thr del gen *XRCC3*, no alcanzándose el grado de significación estadística ( $p > 0,05$ ) (Tabla 42).

**Tabla 42:** Análisis de regresión logística de diferentes variables independientes

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Edad al diagnóstico	1,01	0,95-1,08	0,711
Género	0,59	0,24-1,41	0,234
Educación	0,88	0,51-1,49	0,627
Depresión	0,84	0,35-2,05	0,707
Psicosis	3,33	1,35-8,22	<b>0,009</b>
IACHe/memantina	3,14	1,84-5,36	<b>0,0001</b>
Tiempo de seguimiento	0,53	0,38-0,73	<b>0,0001</b>
Portador de APOE ε4	0,94	0,38-2,29	0,892
Genotipo Thr/Thr de XRCC3	1,93	0,77-4,84	0,159

#### 4.1.5: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Arg399Gln DEL GEN *XRCC1* ENTRE DEMENCIA VASCULAR Y CONTROLES

En la tabla 43 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* en los 200 casos con Demencia Vascul ar y los 201 controles. En el modelo codominante se muestra una tendencia de los individuos portadores del genotipo Gln/Gln de dicho polimorfismo a presentar un mayor riesgo de Demencia Vascul ar, no alcanzándose la significación estadística ( $p = 0,083$ ). De modo similar, en el modelo dominante, aunque los individuos con el alelo Gln (Arg/Gln+Gln/Gln) frente a aquellos con el genotipo Arg/Arg presentan un mayor riesgo de tener Demencia Vascul ar, las diferencias encontradas no

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

alcanzan la significación estadística ( $p=0,074$ ). Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,345$ ).

**Tabla 43:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Demencia Vascular y controles relacionados con el polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95%	P
Codominante	Arg/Arg	83 (41,3%)	64 (32,0%)	1		
	Arg/Gln	97(48,3%)	107 (53,5%)	1,39	(0,90-2,14)	0,140
	Gln/Gln	21 (10,4%)	29 (14,5%)	1,79	(0,93-3,47)	0,083
Dominante	Arg/Arg	83 (41,3%)	64 (32,0%)	1		
	Arg/Gln+Gln/Gln	118 (58,7%)	136 (68,0%)	1,46	(0,96-2,22)	0,074
Recesivo	Gln/Gln	21 (10,4%)	29 (14,5%)	1		
	Arg/Arg+Arg/Gln	180 (89,6%)	171 (85,5%)	0,68	(0,37-1,24)	0,207

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como de la APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1*.

En la tabla 4 del Anexo V II se muestran los modelos de herencia para los dos grupos de edad que hemos seleccionado. Para los individuos mayores de 80 años se aprecia que tanto en el modelo dominante como en el codominante los individuos portadores del alelo Gln tienen un riesgo aumentado de tener Demencia Vascular que es de 2,63 veces más en heterocigotos Arg/Gln y 2,88 veces más en homocigotos Gln/Gln en el codominante y 2,68 veces más para Arg/Gln + Gln/Gln en el dominante alcanzándose en ambas situaciones la significación estadística (codominante  $p=0,004$  y  $0,037$  y dominante  $p=0,002$ ). En cambio, entre los individuos de edad igual o inferior a 80 años no se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).

En la tabla 44 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ . En el grupo de los no portadores de APOE  $\epsilon 4$ , tanto en el modelo dominante como en el codominante, los individuos portadores del genotipo Gln/Gln o alelo Gln tienen un riesgo mayor de padecer demencia vascular, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los modelos ( $p>0,05$ ). Sin embargo, esta tendencia no se observa en el grupo de portadores de APOE  $\epsilon 4$ , en el que tampoco se encuentran diferencias estadísticas ( $p>0,05$ ).

**Tabla 44:** Distribución del gen *XRCC1* entre portadores y no portadores de APOE ε4

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 64</b>			
Arg/Arg	6 (26,1%)	19 (29,7%)	1		
Arg/Gln	15 (65,2%)	37 (57,8%)	0,68	(0,22-2,08)	0,497
Gln/Gln	2 (8,7%)	8 (12,5%)	1,24	(0,20-7,66)	0,817
Dominante			0,74	(0,25-2,21)	0,597
Recesivo			0,64	(0,12-3,32)	0,591
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 136</b>			
Arg/Arg	77 (43,3%)	45 (33,1%)	1		
Arg/Gln	82 (46,1%)	70 (51,5%)	1,45	(0,88-2,38)	0,145
Gln/Gln	19 (10,7%)	21 (15,4%)	1,91	(0,91-3,98)	0,085
Dominante			1,54	(0,96-2,47)	0,076
Recesivo			0,64	(0,33-1,27)	0,205

#### 4.1.5.1: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Arg399Gln DEL GEN *XRCC1* ENTRE SUBTIPO DE DEMENCIA VASCULAR CORTICAL O SUBCORTICAL

En la tabla 45 se analizan los modelos de herencia según si la Demencia Vascular (DV) es cortical o subcortical. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Arg399Gln del gen *XRCC1* entre pacientes con DV cortical y controles ( $p > 0,05$ ). Tampoco se alcanzó significación estadística en la comparativa entre el grupo de DV subcortical y controles para ninguno de los tres modelos, aunque se apreció que la presencia del alelo Gln en el modelo dominante muestra una tendencia a mayor riesgo de demencia vascular subcortical ( $p > 0,05$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 45:** Distribución de los genotipos del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* entre los subgrupos de Demencia Vascular y los casos.

Modelo	Controles (N)	Casos Cortical (N)	DVOR	IC (95%)	P
	<b>N= 201</b>	<b>N = 99</b>			
Arg/Arg	83 (41,3%)	33 (33,3%)	1		
Arg/Gln	97 (48,3%)	51 (51,5%)	1,24	(0,72-2,12)	0,441
Gln/Gln	21 (10,4%)	15 (15,2%)	1,68	(0,76-3,72)	0,197
Dominante			1,32	(0,79-2,20)	0,295
Recesivo			0,67	(0,32-1,39)	0,286
Modelo	Controles (N)	CASOS Subcortical (N)	DVOR	IC (95%)	P
	<b>N= 201</b>	<b>N= 101</b>			
Arg/Arg	83 (41,3%)	31 (30,7%)	1		
Arg/Gln	97 (48,3%)	56 (55,4%)	1,41	(0,82-2,43)	0,209
Gln/Gln	21 (10,4%)	14 (13,9%)	1,75	(0,78-3,91)	0,173
Dominante			1,48	(0,88-2,48)	0,139
Recesivo			0,70	(0,34-1,47)	0,349

Se ha estudiado la influencia del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE en la distribución genotípica del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* en los diferentes subtipos de Demencia Vascular.

Entre los pacientes con DV cortical no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes genotipos frente al grupo control ni en los portadores ni en los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  para ninguno de los tres modelos ( $p > 0,05$ ). (Tabla 46)

**Tabla 46:** Distribución de los genotipos del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* entre los pacientes con DV Cortical y los controles según APOE  $\epsilon 4$

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 31</b>			
Arg/Arg	6 (26,1%)	9 (29,0%)	1		
Arg/Gln	15 (65,2%)	17 (54,8%)	0,68	(0,19-2,50)	0,563
Gln/Gln	2 (8,7%)	5 (16,1%)	1,73	(0,24-12,34)	0,583
Dominante			0,82	(0,23-2,85)	0,751
Recesivo			0,45	(0,08-2,64)	0,380
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Arg/Arg	77 (43,3%)	24 (35,3%)	1		
Arg/Gln	82 (46,1%)	34 (50%)	1,25	(0,67-2,34)	0,475
Gln/Gln	19 (10,7%)	10 (14,7%)	1,56	(0,62-3,92)	0,341
Dominante			1,31	(0,73-2,38)	0,367
Recesivo			0,73	(0,31-1,70)	0,463

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Entre los pacientes con DV subcortical, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control en los diferentes genotipos del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* al analizar exclusivamente a aquellos individuos portadores del alelo APOE ε4. En cambio, entre los sujetos no portadores del alelo APOE ε4 se apreció que la presencia del genotipo Gln/Gln en el modelo codominante y del alelo Gln en el modelo dominante se relaciona con una tendencia a un riesgo mayor de padecer la enfermedad, aunque sin alcanzarse la significación estadística ( $p>0,05$ ) (Tabla 47)

**Tabla 47:** Distribución de los genotipos del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* entre los pacientes con DV Subcortical y los controles según APOE ε4.

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 33</b>			
Arg/Arg	6 (26,1%)	10 (30,3%)	1		
Arg/Gln	15 (65,2%)	20 (60,6%)	0,67	(0,19-2,36)	0,531
Gln/Gln	2 (8,7%)	3 (9,1%)	0,78	(0,08-7,27)	0,828
Dominante			0,67	(0,19-2,32)	0,530
Recesivo			1,00	(0,13-7,80)	1,000
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Arg/Arg	77 (43,3%)	21 (30,9%)	1		
Arg/Gln	82 (46,1%)	36 (52,9%)	1,47	(0,78-2,78)	0,235
Gln/Gln	19 (10,7%)	11 (16,2%)	2,08	(0,84-5,11)	0,112
Dominante			1,60	(0,87-2,93)	0,127
Recesivo			0,60	(0,26-1,36)	0,222

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en los pacientes con Demencia Vasculare, y los subtipos cortical y subcortical frente al grupo control. Aunque en dicho análisis, considerando el genotipo Arg/Arg de referencia, los sujetos portadores del alelo Gln (Arg/Gln+Gln/Gln) en el modelo dominante y de los genotipos Arg/Gln y Gln/Gln en el codominante mostraron tendencia a un mayor riesgo para Demencia Vasculare, en general, y DV subcortical, en particular, los resultados no son estadísticamente ( $p>0,05$ ). (Tabla 48)

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 48:** Análisis de regresión logística del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* y los casos de Demencia Vascular

MODELO	GENOTIPO	DV		DV Cortical		DV Subcortical	
		OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
Codominante	Arg/Arg	1		1		1	
	Arg/Gln	1,43 (0,92-2,27)	0,124	1,30 (0,74-2,28)	0,364	1,63 (0,91-2,91)	0,099
	Gln/Gln	1,78 (0,89-3,56)	0,101	1,86 (0,81-4,23)	0,141	1,80 (0,76-4,26)	0,179
Dominante	Arg/Arg	1		1		1	
	Arg/Gln+Gln/Gln	1,49 (0,96-2,32)	0,073	1,40 (0,81-2,39)	0,224	1,66 (0,95-2,90)	0,073
Recesivo	Gln/Gln	1		1		1	
	Arg/Gln+Arg/Arg	0,70 (0,37-1,31)	0,264	0,63 (0,30-1,34)	0,229	0,75 (0,34-1,63)	0,465

### 4.1.6: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Lys751Gln DEL GEN *ERCC2* ENTRE DEMENCIA VASCULAR Y CONTROLES

En la tabla 49 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2* en los 200 casos con Demencia Vascul ar y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Lys751Gln del gen *ERCC2* entre pacientes con Demencia Vascul ar y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,096$ ).

**Tabla 49:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Demencia Vascul ar y controles relacionados con el polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	Casos N (%)	OR	IC del 95%	P
Codominante	Lys/Lys	92 (45,8%)	84 (42,0%)	1		
	Lys/Gln	80 (39,8%)	86 (43,0%)	1,23	(0,80-1,90)	0,352
	Gln/Gln	29 (14,4%)	30 (15,0%)	1,21	(0,66-2,21)	0,533
Dominante	Lys/Lys	92 (45,8%)	84 (42,0%)	1		
	Lys/Gln+Gln/Gln	109 (54,2%)	116 (58,0%)	1,22	(0,82-1,83)	0,327
Recesivo	Gln/Gln	29 (14,4%)	30 (15,0%)	1		
	Lys/Gln+Lys/Lys	172 (85,6%)	170 (85,0%)	0,92	(0,52-1,60)	0,755

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2*.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

En la tabla 5 del Anexo VII se muestran los modelos de herencia para los dos grupos de edad analizados. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el grupo de individuos mayores de 80 años ni en el de aquellos de edad igual o inferior a 80 años ( $p>0,05$ ).

En la tabla 50 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ . Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en el grupo de portadores de APOE  $\epsilon 4$  ni en aquellos no portadores de APOE  $\epsilon 4$  para ninguno de los modelos ( $p>0,05$ ).

**Tabla 50:** Distribución del gen *ERCC2* entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE 4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 64</b>			
Lys/Lys	12 (52,2%)	31 (48,4%)	1		
Lys/Gln	6 (26,1%)	25 (39,1%)	1,55	(0,50-4,82)	0,451
Gln/Gln	5 (21,7%)	8 (12,5%)	0,61	(0,15-2,37)	0,473
Dominante			1,22	(0,46-3,21)	0,687
Recesivo			1,94	(0,53-7,16)	0,318
<b>APOE 4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 136</b>			
Lys/Lys	80 (44,9%)	53 (39%)	1		
Lys/Gln	74 (46,1%)	61 (44,9%)	1,32	(0,80-2,16)	0,278
Gln/Gln	24 (13,5%)	22 (16,2%)	1,44	(0,72-2,88)	0,302
Dominante			1,35	(0,85-2,15)	0,209
Recesivo			0,80	(0,42-1,52)	0,499

### 4.1.6.1: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Lys751Gln DEL GEN *ERCC2* ENTRE SUBTIPO DE DEMENCIA VASCULAR CORTICAL O SUBCORTICAL

En la tabla 51 se analizan los modelos de herencia según si la Demencia Vascul ar (DV) es cortical o subcortical. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de los diferentes genotipos de Lys751Gln del gen *ERCC2* entre pacientes con DV cortical y controles ( $p>0,05$ ). Tampoco se alcanzó significación estadística en la comparativa entre el grupo de DV subcortical y controles ( $p>0,05$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 51:** Distribución de los genotipos del polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2* entre los subgrupos de Demencia Vascul ar y los casos.

Modelo	Controles (N)	Casos DV Cortical (N)	OR	IC (95%)	P
	<b>N= 201</b>	<b>N = 99</b>			
Lys/Lys	92 (45,8%)	41 (41,4%)	1		
Lys/Gln	80 (39,8%)	43 (43,4%)	1,25	(0,73-2,14)	0,415
Gln/Gln	29 (14,4%)	15 (15,2%)	1,24	(0,59-2,60)	0,562
Dominante			1,25	(0,76-2,06)	0,378
Recesivo			0,90	(0,45-1,78)	0,756
Modelo	Controles (N)	Casos DV Subcortical (N)	OR	IC (95%)	P
	<b>N= 201</b>	<b>N= 101</b>			
Lys/Lys	92 (45,8%)	43 (42,6%)	1		
Lys/Gln	80 (39,8%)	43 (42,6%)	1,17	(0,69-1,99)	0,552
Gln/Gln	29 (14,4%)	15 (14,9%)	1,08	(0,52-2,27)	0,835
Dominante			1,15	(0,70-1,88)	0,578
Recesivo			0,99	(0,49-1,99)	0,998

Se ha estudiado la influencia de la variable APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2* entre los diferentes subtipos de Demencia Vascul ar.

En la tabla 52 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no de APOE  $\epsilon 4$  en los pacientes con DV cortical y controles. En el grupo de portadores de APOE  $\epsilon 4$  tanto en el modelo codominante como en el recesivo los individuos portadores del genotipo Lys/Lys muestran una tendencia a un riesgo menor de padecer DV cortical frente a aquellos con el genotipo Gln/Gln o el alelo Gln (Lys/Gln+Gln/Gln) respectivamente, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los dos modelos ( $p > 0,05$ ). En el grupo de los no portadores de APOE  $\epsilon 4$  también se observa una tendencia a un riesgo menor de padecer DV cortical para los individuos portadores del genotipo Lys/Lys vs Gln/Gln en el modelo codominante y del genotipo Lys/Lys vs Lys/Gln+Gln/Gln en el dominante, sin ser este resultado tampoco estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 52:** Distribución del gen *ERCC2* entre portadores y no portadores de APOE ε4 en DV Cortical

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 31</b>			
Lys/Lys	12 (52,2%)	17 (54,8%)	1		
Lys/Gln	6 (26,1%)	11 (35,5%)	1,21	(0,32-4,53)	0,779
Gln/Gln	5 (21,7%)	3 (9,7%)	0,17	(0,02-1,68)	0,130
Dominante			0,92	(0,30-2,81)	0,886
Recesivo			6,17	(0,65-58,42)	0,113
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Lys/Lys	80 (44,9%)	24 (35,3%)	1		
Lys/Gln	74 (41,6%)	32 (47,1%)	1,47	(0,78-2,77)	0,233
Gln/Gln	24 (13,5%)	12 (17,6%)	1,75	(0,75-4,11)	0,195
Dominante			1,54	(0,85-2,79)	0,155
Recesivo			0,70	(0,32-1,52)	0,364

En la tabla 53 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no de APOE ε4 en los pacientes con DV subcortical y controles. Ni en el grupo de portadores de APOE ε4 ni en aquellos no portadores de APOE ε4 se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres modelos ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 53:** Distribución del gen *ERCC2* entre portadores y no portadores de APOE ε4 en DV Subcortical

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 33</b>			
Lys/Lys	12 (52,2%)	14 (42,4%)	1		
Lys/Gln	6 (26,1%)	14 (42,4%)	1,88	(0,52-6,77)	0,333
Gln/Gln	5 (21,7%)	5 (15,2%)	0,96	(0,22-4,26)	0,958
Dominante			1,51	(0,50-4,58)	0,467
Recesivo			1,35	(0,33-5,47)	0,677
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Lys/Lys	80 (44,9%)	29 (42,6%)	1		
Lys/Gln	74 (41,6%)	29 (42,6%)	1,11	(0,60-2,06)	0,735
Gln/Gln	24 (13,5%)	10 (14,7%)	1,08	(0,45-2,59)	0,870
Dominante			1,11	(0,62-1,97)	0,729
Recesivo			0,98	(0,43-2,23)	0,961

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en la comparativa entre los pacientes con demencia vascular, y los subtipos cortical y subcortical y el grupo control. Los resultados no son estadísticamente significativos para el polimorfismo para Lys751Gln del gen *ERCC2* ni

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

en el grupo de demencia vascular, ni en el subgrupo de DV cortical ni en el subgrupo de DV subcortical en su comparación con el grupo control. (Tabla 54)

**Tabla 54:** Análisis de regresión logística para Lys751Gln del gen *ERCC2*

MODELO	GENOTIPO	DV TOTAL			DV Cortical			DV Subcortical		
		OR 95%)	(IC	P	OR 95%)	(IC	P	OR 95%)	(IC	P
CODOMINANTE	Lys/Lys	1			1			1		
	Lys/Gln	1,25 (0,79- 1,97)	0,340		1,25 (0,72- 2,19)	0,424		1,25 (0,71- 2,21)	0,432	
	Gln/Gln	1,22 (0,65- 2,29)	0,532		1,21 (0,56- 2,59)	0,629		1,06 (0,49- 2,32)	0,881	
DOMINANTE	Lys/Lys	1			1			1		
	Lys/Gln+ Gln/Gln	1,24 (0,81- 1,89)	0,316		1,24 (0,74- 2,09)	0,407		1,21 (0,71- 2,04)	0,481	
	Gln/Gln	1			1			1		
RECESIVO	Lys/Gln+ Lys/Lys	0,91 (0,51- 1,64)	0,760		0,93 (0,46- 1,89)	0,835		1,05 (0,50- 2,18)	0,899	

### 4.1.7: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Thr241Met DEL GEN *XRCC3* ENTRE DEMENCIA VASCULAR Y CONTROLES

En la tabla 55 se analiza el riesgo del polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* según el modelo de herencia en Demencia Vascular (DV). Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,995$ ).

Se observó que tanto los individuos Met/Met en el modelo codominante como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de tener Demencia Vascular (6,43 veces mayor en el caso del codominante y 2,20 veces mayor en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,0001$ ;  $p=0,0001$ ).

El modelo recesivo muestra que los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener Demencia Vascular, (0,19 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística ( $p=0,0001$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 55:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Demencia Vascular y controles relacionados con el polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3*

Modelo	Genotipo	Controles N (%)	DV N (%)	OR	IC del 95%	P
<b>Codominante</b>	Thr/Thr	125(62,2%)	87(43,5%)	1		
	Thr/Met	67(33,3%)	74 (37,0%)	1,61	(1,04-2,51)	<b>0,034</b>
	Met/Met	9 (4,5%)	39 (19,5%)	6,43	(2,93-14,08)	<b>0,0001</b>
<b>Dominante</b>	Thr/Thr	125(62,2%)	87(43,5%)	1		
	Thr/Met+Met/Met	76 (37,8%)	113 (56,5%)	2,20	(1,46-3,31)	<b>0,0001</b>
<b>Recesivo</b>	Met/Met	9(4,5%)	39 (19,5%)	1		
	Thr/Met+Thr/Thr	192(95,5%)	161(80,5%)	0,19	(0,09-0,40)	<b>0,0001</b>

Estos hallazgos nos permiten concluir que los portadores del alelo Met tienen aumentado el riesgo de padecer demencia vascular, y que ello sucede independientemente de la edad y del género.

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3*.

En la tabla 6 del Anexo VII se analizan los modelos de herencia según la edad. En el grupo de  $\leq$  de 80 años, los individuos portadores del genotipo Met/Met en el modelo codominante presentan un riesgo 11,19 veces mayor de padecer Demencia Vasculuar, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p= 0,0001$ ). En el modelo recesivo los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener Demencia Vasculuar, (0,09 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística ( $p=0,0001$ ).

En el grupo de  $>$  de 80 años los individuos portadores del genotipo Met/Met en el modelo codominante así como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de tener Demencia Vasculuar (3,64 veces y 2,15 veces, respectivamente), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,015$ ;  $p=0,011$ ). Asimismo, los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr+Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener Demencia Vasculuar, (0,36 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística ( $p=0,045$ ).

En la tabla 56 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no de APOE  $\epsilon 4$ . En el grupo de portadores de APOE  $\epsilon 4$ , los individuos Met/Met en el modelo codominante como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

riesgo de tener Demencia Vascular (10,74 veces mayor en el caso del codominante y 3,22 veces mayor en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,030$ ;  $p=0,024$ ).

En el grupo de los no portadores de APOE  $\epsilon 4$ , los individuos Met/Met en el modelo codominante como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de tener Demencia Vascular (5,27 veces en el codominante y 1,94 veces en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,0001$ ;  $p=0,006$ ). En el modelo recesivo los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener Demencia Vascular, (0,22 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística ( $p=0,001$ ).

**Tabla 56:** Distribución del gen *XRCC3* entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 64</b>			
Thr/Thr	15 (65,2%)	24 (37,5%)	1		
Thr/Met	7 (30,4%)	24 (37,5%)	2,18	(0,74-6,42)	0,156
Met/Met	1 (4,3%)	16 (25,0%)	10,74	(1,26-91,55)	<b>0,030</b>
Dominante			3,22	(1,17-8,87)	<b>0,024</b>
Recesivo			0,13	(0,02-1,05)	0,056
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 136</b>			
Thr/Thr	110 (61,8%)	63 (46,3%)	1		
Thr/Met	60 (33,7%)	50 (36,8%)	1,48	(0,89-2,46)	0,126
Met/Met	8 (4,5%)	23 (16,9%)	5,27	(2,19-12,66)	<b>0,0001</b>
Dominante			1,94	(1,21-3,10)	<b>0,006</b>
Recesivo			0,22	(0,09-0,52)	<b>0,001</b>

### 4.1.7.1: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Thr241Met DEL GEN *XRCC3* ENTRE SUBTIPOS DE DEMENCIA VASCULAR CORTICAL O SUBCORTICAL

En la tabla 57 se analizó el riesgo del polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* según el modelo de herencia en los diferentes subtipos de Demencia Vascular (DV).

En la comparativa entre el grupo de DV cortical y el grupo control se observó que tanto los individuos portadores del genotipo Met/Met en el modelo codominante como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de tener DV cortical (5,16 veces mayor en el caso del codominante y 1,99 veces mayor en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,0001$ ;  $p=0,007$ ). En el modelo recesivo, los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

DV cortical, (0,23 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística ( $p=0,001$ ).

En el análisis comparativo entre el grupo de DV subcortical y el grupo control se observó que tanto los individuos portadores del genotipo Met/Met en el modelo codominante como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de tener DV subcortical (8,41 veces mayor en el caso del codominante y 2,52 veces mayor en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,0001$ ;  $p=0,0001$ ). En el modelo recesivo, los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener DV Subcortical, (0,15 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística ( $p=0,0001$ ).

**Tabla 57:** Distribución del gen *XRCC3* según subtipo de DV

Tabla 57: Distribución del gen <i>XRCC3</i> según subtipo de DV					
Modelo	Controles (N)	Casos DVOR Cortical (N)	DVOR	IC (95%)	p
	<b>N= 201</b>	<b>N = 99</b>			
Thr/Thr	125 (62,2%)	46 (46,5%)	1		
Thr/Met	67 (33,3%)	37 (37,4%)	1,55	(0,90-2,67)	0,112
Met/Met	9 (4,5%)	16 (16,2%)	5,16	(2,10-12,71)	<b>0,0001</b>
Dominante			1,99	(1,20-3,29)	<b>0,007</b>
Recesivo			0,23	(0,10-0,55)	<b>0,001</b>
Modelo	Controles (N)	Casos DVOR Subcortical (N)	DVOR	IC (95%)	p
	<b>N= 201</b>	<b>N= 101</b>			
Thr/Thr	125 (62,2%)	41 (40,6%)	1		
Thr/Met	67 (33,3%)	37 (36,6%)	1,73	(1,00-3,01)	0,052
Met/Met	9 (4,5%)	23 (22,8%)	8,41	(3,53-20,05)	<b>0,0001</b>
Dominante			2,52	(1,52-4,18)	<b>0,0001</b>
Recesivo			0,15	(0,07-0,34)	<b>0,0001</b>

Se ha estudiado la influencia de la presencia del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE en la distribución genotípica del polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* entre los diferentes subtipos de demencia vascular.

En la tabla 58 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no de APOE  $\epsilon 4$  entre los pacientes con DV cortical y controles. Entre los pacientes portadores del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE se observó que los individuos portadores del genotipo Met/Met en el modelo codominante y del alelo Met en el modelo dominante muestran una tendencia a un mayor riesgo de padecer DV cortical, sin ser estos resultados estadísticamente significativos ( $p=0,144$  y  $p=0,185$ , respectivamente). En el modelo recesivo se apreció que los

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) presentan una tendencia a un riesgo disminuido de tener DV cortical, sin ser este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,191$ ).

Por otro lado, entre los pacientes y controles no portadores de APOE  $\epsilon 4$  se apreció que tanto los individuos portadores del genotipo Met/Met en el modelo codominante como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de tener DV cortical (4,95 veces mayor en el caso del codominante y 1,96 veces mayor en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,002$ ;  $p=0,024$ ). En el modelo recesivo, los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener DV cortical, (0,24 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística ( $p=0,005$ ).

**Tabla 58:** Distribución del gen *XRCC3* entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$  en DV Cortical

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 31</b>			
Thr/Thr	15 (65,2%)	15 (48,4%)	1		
Thr/Met	7 (30,4%)	11 (35,5%)	1,70	(0,50-5,81)	0,396
Met/Met	1 (4,3%)	5 (16,1%)	5,63	(0,56-57,00)	0,144
Dominante			2,18	(0,69-6,92)	0,185
Recesivo			0,22	(0,02-2,12)	0,191
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Thr/Thr	110 (61,8%)	31 (45,6%)	1		
Thr/Met	60 (33,7%)	26 (38,2%)	1,54	(0,82-2,90)	0,178
Met/Met	8 (4,5%)	11 (16,2%)	4,95	(1,78-13,74)	<b>0,002</b>
Dominante			1,96	(1,09-3,52)	<b>0,024</b>
Recesivo			0,24	(0,09-0,64)	<b>0,005</b>

En la tabla 59 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no de APOE  $\epsilon 4$  entre los pacientes con DV subcortical y controles. Entre los pacientes portadores de APOE  $\epsilon 4$  se apreció que tanto los individuos portadores del genotipo Met/Met en el modelo codominante como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de tener DV subcortical (23,88 veces mayor en el caso del codominante y 5,31 veces mayor en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,009$ ;  $p=0,009$ ). En el modelo recesivo, los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener DV subcortical, (0,08 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística ( $p=0,027$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Entre los pacientes y controles no portadores de APOE ε4 se observó que tanto los individuos portadores del genotipo Met/Met en el modelo codominante como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de tener DV subcortical (6,10 veces mayor en el caso del codominante y 1,97 veces mayor en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística (p=0,001; p=0,024). En el modelo recesivo, los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener DV subcortical , (0,19 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística (p=0,001).

**Tabla 59:** Distribución del gen *XRCC3* entre portadores y no portadores de APOE ε4 en DV subcortical

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 33</b>			
Thr/Thr	15 (65,2%)	9 (27,3%)	1		
Thr/Met	7 (30,4%)	13 (39,4%)	3,40	(0,91-12,71)	0,069
Met/Met	1 (4,3%)	11 (33,3%)	23,88	(2,24-254,99)	<b>0,009</b>
Dominante			5,31	(1,51-18,63)	<b>0,009</b>
Recesivo			0,08	(0,01-0,75)	<b>0,027</b>
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Thr/Thr	110 (61,8%)	32 (47,1%)	1		
Thr/Met	60 (33,7%)	24 (35,3%)	1,45	(0,76-2,75)	0,261
Met/Met	8 (4,5%)	12 (17,6%)	6,10	(2,22-16,75)	<b>0,001</b>
Dominante			1,97	(1,09-3,54)	<b>0,024</b>
Recesivo			0,19	(0,07-0,50)	<b>0,001</b>

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en la comparativa entre los pacientes con demencia vascular, y los subtipos cortical y subcortical y el grupo control.

Se apreció que tanto al comparar los casos de Demencia Vascular en conjunto, así como los subtipos DV cortical y DV subcortical por separado, los individuos portadores del genotipo Met/Met en el modelo codominante y los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de presentar la enfermedad siendo estos resultados en todos los casos estadísticamente significativos. En el modelo recesivo, en los 3 casos también se apreció que los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de presentar la enfermedad, siendo estos resultados estadísticamente significativos. (Tabla 60)

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Estos resultados refuerzan el hecho de que ser portador del alelo Met en el polimorfismo Thr241Met actúa como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, así como que ser portador del alelo Thr ejerce un efecto protector.

**Tabla 60:** Análisis de regresión logística en el polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3*

MODELO	GENOTIPO	DV TOTAL			DV Cortical			DV Subcortical		
		OR 95%)	(IC	P	OR 95%)	(IC	P	OR 95%)	(IC	P
CODOMINANTE	Thr/Thr	1			1			1		
	Thr/Met	1,59 (1,00-2,53)		<b>0,050</b>	1,63 (0,93-2,87)		0,089	1,63 (0,90-2,93)		0,104
	Met/Met	5,97 (2,66-13,40)		<b>0,0001</b>	4,57 (1,80-11,59)		<b>0,001</b>	8,02 (3,16-20,37)		<b>0,0001</b>
DOMINANTE	Thr/Thr	1			1			1		
	Thr/Met+ Met/Met	2,13 (1,39-3,28)		<b>0,001</b>	2,03 (1,20-3,42)		<b>0,008</b>	2,37 (1,38-4,05)		<b>0,002</b>
RECESIVO	Met/Met	1			1			1		
	Thr/Met+ Thr/Thr	0,20 (0,09-0,44)		<b>0,0001</b>	0,27 (0,11-0,65)		<b>0,004</b>	0,15 (0,06-0,38)		<b>0,0001</b>

### 4.2 POLIMORFISMO Met129Val DEL GEN *PrNP* (rs1799990)

En relación al gen *PrNP* se estudió el polimorfismo Met129Val. Este polimorfismo produce un cambio de Metionina (Met) por Valina (Val) en el codón 129, lo que da lugar a tres posibles fenotipos; Met/Met, Val/Val, Met/Val.

En este polimorfismo, antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,086$ ).

#### 4.2.1 ESTUDIO COMPARATIVO DEL POLIMORFISMO Met129Val DEL GEN *PrNP* ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES

En la tabla 61 se analiza el riesgo del polimorfismo Met129Val del gen *PrNP* para Enfermedad de Alzheimer según distintos modelos de herencia, observándose que los portadores del genotipo Met/Val presentan una tendencia a mayor riesgo de Enfermedad de Alzheimer frente a aquellos con el genotipo Met/Met en el modelo codominante ( $p=0,081$ ), pero no existen diferencias significativas en ninguno de los modelos ( $p>0,05$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 61:** Análisis del riesgo del polimorfismo Met129Val en función del modelo de herencia

Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Alzheimer N (%)	OR	IC del 95%	P
Codominante	Met/Met	98 (48,8%)	82 (41%)	1		
	Met/Val	77 (38,3%)	96 (48%)	1,50	(0,39-0,97)	0,081
	Val/Val	26 (12,9%)	22 (11%)	0,91	(0,10-0,73)	0,791
Dominante	Met/Met	98 (48,8%)	82 (41%)	1		
	Met/Val + Val/Val	103 (51,2%)	118 (59%)	1,35	(0,36-0,86)	0,170
Recesivo	Val/Val	26 (12,9%)	22 (11%)	1		
	Met/Val+ Met/Met	175 (87,1%)	178 (89%)	1,34	(1,13-7,6)	0,382

En la tabla 7 del Anexo VII se analizan los modelos de herencia para los dos grupos de edad que hemos seleccionado. Para los individuos con edad  $\leq 80$  años se observa en el modelo recesivo una tendencia de los individuos portadores del alelo Met (Met/Val+Met/Met) a un mayor riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer frente a aquellos con el genotipo Val/Val, no alcanzándose significación estadística ( $p > 0,05$ ).

Para los individuos mayores de 80 años se aprecia que los individuos portadores del genotipo Met/Val presentan una tendencia a un riesgo aumentado de tener demencia tipo Alzheimer frente a aquellos con el genotipo Met/Met, no alcanzándose significación estadística ( $p = 0,121$ ).

Por otro lado, se estudió la influencia del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Met129Val. En la tabla 62 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no de APOE  $\epsilon 4$ . Entre aquellos individuos no portadores de APOE  $\epsilon 4$ , se demostró una asociación directa entre Enfermedad de Alzheimer y el genotipo Met/Val con una  $p = 0,011$  en el modelo codominante y el alelo Val (Met/Val+Val/Val) con una  $p = 0,025$  en el dominante. En cambio, entre los portadores del alelo  $\epsilon 4$  no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 62:** Distribución del Met129Val entre portadores y no portadores de APOE ε4

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 78</b>			
Met/Met	7 (30,4%)	37 (47,4%)	1		
Met/Val	12 (52,2%)	33 (42,4%)	0,48	(0,16-1,43)	0,188
Val/Val	4 (17,4%)	8 (10,3%)	0,33	(0,07-1,58)	0,165
Dominante			0,45	(0,16-1,26)	0,126
Recesivo			2,04	(0,49-8,49)	0,328
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 122</b>			
Met/Met	91 (51,1%)	45 (36,9%)	1		
Met/Val	65 (36,5%)	63 (51,1%)	1,93	(1,16-3,20)	<b>0,011</b>
Val/Val	22 (12,4%)	14 (11,5%)	1,15	(0,52-2,53)	0,723
Dominante			1,73	(0,64-2,08)	<b>0,025</b>
Recesivo			1,21	(0,58-2,54)	0,611

#### 4.2.2 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO Met129Val DEL GEN *PrNP* Y PROGRESIÓN EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

También se analizó la influencia del polimorfismo Met129Val en la progresión rápida o normal de la Enfermedad de Alzheimer. Se definió como progresión rápida la disminución en puntuación MMSE  $\geq 4,5$  puntos al año. En general, la progresión fue más rápida en los individuos Met/Val (25,0%) que en los individuos Met/Met (11,0%) o Val/Val (9,5%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,027$ ).

Entre los portadores del alelo APOE ε4, un 27,3% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Met/Val presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 10,7% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Met/Met y el 0% de los Val/Val, alcanzándose la significación estadística ( $p= 0,044$ ).

En cambio, entre los no portadores del alelo APOE ε4, a pesar de que un 23,8% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Met/Val presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 11,1% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Met/Met y 14,3% Val/Val, no alcanzó esta relación la significación estadística ( $p=0,222$ ). (Tabla 63)

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 63.** Distribución del gen *PrNP* según la progresión de Enfermedad de Alzheimer

		EA RAPIDA PROGRESION, N (%)	EA PROGRESION NORMAL, N (%)	P
<b>TOTAL</b>	Met/Met	9 (11,0%)	73 (89,0%)	<b>0,027</b>
	Met/Val	24 (25,0%)	72 (75,0%)	
	Val/Val	2 (9,1%)	20 (90,9%)	
<b>APOE ε4 (+)</b>	Met/Met	4 (10,8%)	33 (89,2%)	<b>0,044</b>
	Met/Val	9 (27,3%)	24 (72,7%)	
	Val/Val	0 (0,0%)	8 (100,0%)	
<b>APOE ε4 (-)</b>	Met/Met	5 (11,1%)	40 (88,9%)	0,222
	Met/Val	15 (23,8%)	48 (76,2%)	
	Val/Val	2 (14,3%)	12 (85,7%)	

Asimismo, se realizó un análisis de regresión logística ajustado por factores clásicos que habitualmente afectan a la progresión de la Enfermedad de Alzheimer, para calcular los efectos del alelo ε4 del polimorfismo APOE y del genotipo Met129Val del gen *PrNP* sobre la progresión rápida de la EA. (Tabla 64). El análisis de estas variables determinó una vez más que la presencia de síntomas psicóticos, el tratamiento con inhibidores de la Acetilcolinesterasa (IACHÉ) o memantina y el tiempo de seguimiento son factores que se relacionaron con una progresión más rápida de la enfermedad ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el hecho de ser portador del genotipo Val/Val de PRNP mostró una tendencia a un menor riesgo de progresión rápida de la enfermedad (0,48) pero no logró alcanzar la significación estadística ( $p = 0,123$ ) en el presente análisis.

**Tabla 64:** Variables asociadas a la progresión rápida de la enfermedad

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Edad al diagnóstico	1,01	0,95-1,08	0,682
Género	0,54	0,22-1,28	0,161
Educación	0,85	0,50-1,45	0,562
Depresión	0,94	0,39-2,26	0,886
Psicosis	3,19	1,29-7,91	<b>0,012</b>
Achel/memantina	3,09	1,81-5,25	<b>0,0001</b>
Tiempo de seguimiento	0,53	0,39-0,73	<b>0,0001</b>
Portador de APOE4	0,84	0,34-2,06	0,699
Genotipo Val/Val del gen <i>PrNP</i>	0,48	0,19-1,22	0,123

## 4.3 ANÁLISIS DE GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA

Se estudiaron cuatro polimorfismos relacionados con la autofagia: Thr300Ala del gen *ATG16L1*, polimorfismo intrónico g.10621860 C>G del gen *ATG5*, Thr212Met del gen *ATG10* y Gln1383Glu del gen *ATG2B*. Las funciones de cada uno de estos polimorfismos se detallan en el capítulo 1. Los resultados observados para cada polimorfismo se presentan a continuación de forma individualizada.

### 4.3.1: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Thr300Ala DEL GEN *ATG16L1* ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES

Se estudió el polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1*, que consiste en una translocación de Adenina (A) por Guanina (G) en el primer nucleótido del codón 300, que provoca un cambio de aminoácido de Treonina (Thr) por Alanina (Ala).

En la tabla 65 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1* en los 200 casos con Enfermedad de Alzheimer y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Thr300Ala entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,966$ ).

**Tabla 65:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Enfermedad de Alzheimer y controles relacionados con el polimorfismo Thr300Ala

Modelo	Genotipo	Controles (%)	NAlzheimer N (%)	OR	IC del 95%	P
<b>Codominante</b>	Thr/Thr	40 (19,9%)	43 (21,5%)	1		
	Thr/Ala	99 (49,3%)	102 (51,0%)	0,95	(0,54-1,68)	0,870
	Ala/Ala	62 (30,8%)	55 (27,5%)	0,82	(0,44-1,53)	0,532
<b>Dominante</b>	Thr/Thr	40 (19,9%)	43 (21,5%)	1		
	Thr/Ala+	161 (80,1%)	157 (78,5%)	0,90	(0,53-1,54)	0,711
	Ala/Ala					
<b>Recesivo</b>	Ala/Ala	62 (30,8%)	55 (27,5%)	1		
	Thr/Thr+	141 (69,2%)	145 (72,5%)	1,18	(0,73-1,91)	0,486
	Thr/Ala					

Se estudió la influencia de la variable edad así como del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Thr300Ala.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

En la tabla 8 del Anexo VII se exponen los resultados del análisis de los genotipos en función de la edad, que no muestra diferencias significativas entre controles y pacientes con Enfermedad de Alzheimer con edad menor o igual a 80 años, ni en el grupo con edad mayor a 80 años para el polimorfismo estudiado ( $p>0,05$ ).

En la tabla 66 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ . Tras el análisis se observó que no se alcanzó la significación estadística para ninguno de los tres modelos ni en los pacientes APOE  $\epsilon 4(+)$  ni en los APOE  $\epsilon 4(-)$  ( $p>0,05$ ).

<b>Tabla 66:</b> Distribución del gen <i>ATG16L1</i> entre portadores y no portadores de APOE $\epsilon 4$					
Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE <math>\epsilon 4 (+)</math></b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 78</b>			
Thr/Thr	5 (21,7%)	15 (19,2%)	1		
Thr/Ala	10 (43,5%)	41 (52,6%)	1,42	(0,39-5,20)	0,594
Ala/Ala	8 (34,8%)	22 (28,2%)	1,25	(0,32-4,98)	0,747
Dominante			1,35	(0,40-5,53)	0,626
Recesivo			1,02	(0,35-2,92)	0,972
<b>APOE <math>\epsilon 4 (-)</math></b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 122</b>			
Thr/Thr	35 (19,7%)	28 (23,0%)	1		
Trhr/Ala	89 (50,0%)	61 (50,0%)	0,87	(0,47-1,60)	0,648
Ala/Ala	54 (30,3%)	33 (27,0%)	0,83	(0,42-1,64)	0,598
Dominante			0,86	(0,48-1,53)	0,599
Recesivo			1,09	(0,64-1,85)	0,740

### 4.3.2: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO INTRÓNICO g.10621860 C>G DE *ATG5* ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES

Situado en la posición 10621866 dentro del cromosoma 6, produce un cambio de citosina (C) por guanina (G).

En la tabla 67 se resume la distribución genotípica del polimorfismo intrónico del gen *ATG5* en los 200 casos con Enfermedad de Alzheimer y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo intrónico del gen *ATG5* entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,521$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 67:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Enfermedad de Alzheimer y controles relacionados con el polimorfismo intrónico del gen *ATG5*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	N Alzheimer N (%)	OR	IC del 95%	P
<b>Codominante</b>	CC	82 (40,8%)	91 (45,5%)	1		
	CG	96 (47,8%)	82 (41,0%)	0,73	(0,46-1,15)	0,174
	GG	23 (11,4%)	27 (13,5%)	1,02	(0,51-2,02)	0,954
<b>Dominante</b>	CC	82 (40,8%)	91 (45,5%)	1		
	CG+GG	119 (59,2%)	109 (54,5%)	0,78	(0,51-1,21)	0,271
<b>Recesivo</b>	GG	23 (11,4%)	27 (13,5%)	1		
	CC+CG	178 (88,6%)	173 (86,5%)	0,84	(0,44-1,60)	0,589

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como de la APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo intrónico del gen *ATG5*.

En la tabla 9 del Anexo V II se analizan los modelos de herencia en función de la edad mayor o menor de 80 años. En dicho análisis no se observó la significación estadística para ninguno de los tres modelos ni en los pacientes con  $\leq 80$  años ni en los  $> 80$  años ( $p > 0,05$ ). En la tabla 68 se analizan los modelos de herencia según si los participantes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ . Tras el análisis se observó que no se alcanzó la significación estadística para ninguno de los tres modelos ni en los pacientes APOE  $\epsilon 4(+)$  ni en los APOE  $\epsilon 4(-)$  ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 68:** Distribución del gen *ATG5* entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE <math>\epsilon 4 (+)</math></b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 78</b>			
CC	6 (26,1%)	32 (41,0%)	1		
CG	15 (65,2%)	36 (46,2%)	0,40	(0,12-1,32)	0,132
GG	2 (8,7%)	10 (12,8%)	0,71	(0,12-4,39)	0,717
Dominante			0,45	(0,14-1,41)	0,171
Recesivo			0,86	(0,16-4,61)	0,863
<b>APOE <math>\epsilon 4 (-)</math></b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 122</b>			
CC	76 (42,7%)	59 (48,4%)	1		
CG	81 (45,5%)	46 (37,7%)	0,82	(0,49-1,37)	0,453
GG	21 (11,8%)	17 (13,9%)	1,00	(0,47-2,13)	0,998
Dominante			0,87	(0,54-1,40)	0,565
Recesivo			0,91	(0,44-1,87)	0,801

### 4.3.3.: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Thr212Met DEL GEN *ATG10* ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES

El polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10* consiste en una transición de citosina (C) por timina (T) en el segundo nucleótido del codón 212 que produce un cambio de Treonina (Thr) por Metionina (Met).

En la tabla 69 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10* en los 200 casos con Enfermedad de Alzheimer y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10* entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,552$ ).

**Tabla 69:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Enfermedad de Alzheimer y controles relacionados con el polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	Alzheimer N (%)	OR	IC del 95%	P
Codominante	Thr/Thr	58 (28,9%)	47 (23,5%)	1		
	Thr/Met	96 (47,8%)	108 (54,0%)	1,25	(0,75-2,08)	0,390
	Met/Met	47 (23,4%)	45 (22,5%)	0,94	(0,51-1,74)	0,850
Dominante	Thr/Thr	58 (28,9%)	47 (23,5%)	1		
	Thr/Met+ Met/Met	143 (71,1%)	153 (76,5%)	1,15	(0,71-1,86)	0,574
Recesivo	Met/met	47 (23,4%)	45 (22,5%)	1		
	Thr/Met+	154 (76,6%)	155 (77,5%)	1,23	(0,74-2,05)	0,425
	Thr/Thr					

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Thr212Met el gen *ATG10*.

En la tabla 10 del Anexo VII se analizan los modelos de herencia en función de la edad mayor o menor de 80 años. En el análisis no se obtuvo significación estadística para ninguno de los tres modelos ni en los pacientes con  $\leq 80$  años ni en los  $> 80$  años ( $p>0,05$ ).

En la tabla 70 se analizan los modelos de herencia según si los individuos eran portadores o no de APOE  $\epsilon 4$ . Tras el análisis se observó que no se alcanzó la significación estadística para ninguno de los tres modelos ni en los individuos APOE4(+) ni en los APOE4(-) ( $p>0,05$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 70:** Distribución del gen *ATG10* entre portadores y no portadores de APOE ε4

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 78</b>			
Thr/Thr	6 (26,1%)	15 (19,2%)	1		
Thr/Met	12 (52,2%)	40 (51,3%)	1,45	(0,43-4,87)	0,549
Met/Met	5 (21,7%)	23 (29,5%)	1,56	(0,37-6,52)	0,539
Dominante			1,49	(0,47-4,70)	0,499
Recesivo			0,83	(0,26-2,65)	0,750
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 122</b>			
Thr/Thr	52 (29,2%)	32 (26,2%)	1		
Thr/Met	84 (47,2%)	68 (55,7%)	1,26	(0,72-2,22)	0,415
Met/Met	42 (23,6%)	22 (18,0%)	0,83	(0,41-1,67)	0,602
Dominante			1,12	(0,66-1,91)	0,677
Recesivo			1,40	(0,78-2,54)	0,262

### 4.3.4.: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Gln1383Glu DEL GEN *ATG2B* ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES

El polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B* traduce una translocación de citosina (C) por guanina (G) en el primer nucleótido del codón 1383, que provoca un cambio de glutamina por ácido glutámico. En la tabla 71 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B* en los 200 casos con Enfermedad de Alzheimer y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B* entre pacientes con Enfermedad de Alzheimer y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,137$ ).

**Tabla 71:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Enfermedad de Alzheimer y controles relacionados con el polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	N Alzheimer N (%)	OR	IC del 95%	P
<b>Codominante</b>	Gln/Gln	31 (15,4%)	20 (10,0%)	1		
	Gln/Glu	83 (41,3%)	83 (41,5%)	1,35	(0,68-2,69)	0,392
	Glu/Glu	87 (43,3%)	97 (48,5%)	1,58	(0,80-3,11)	0,189
<b>Dominante</b>	Gln/Gln	31 (15,4%)	20 (10,0%)	1		
	Gln/Glu+ Glu/Glu	170 (84,6%)	180 (90,0%)	1,47	(0,77-2,80)	0,243
<b>Recesivo</b>	Glu/Glu	87 (43,3%)	97 (48,5%)	1		
	Gln/Glu+ Gln/Gln	114 (56,7%)	103 (51,5%)	0,80	(0,52-1,23)	0,305

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B*.

En la tabla 11 del Anexo VII se analizan los modelos de herencia en función de la edad mayor o menor de 80 años. En el análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres modelos ni en los pacientes con  $\leq 80$  años ni en los  $> 80$  años ( $p>0,05$ ).

En la tabla 72 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ . Tras el análisis se observó que no se alcanzó la significación estadística para ninguno de los tres modelos ni en los pacientes APOE4(+) ni en los APOE4(-) ( $p>0,05$ ).

**Tabla 72:** Distribución del gen *ATG2B* entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 78</b>			
Gln/Gln	3 (13,0%)	7 (9,0%)	1		
Gln/Glu	11 (47,8%)	34 (43,6%)	1,05	(0,21-5,16)	0,954
Glu/Glu	9 (39,1%)	37 (47,4%)	1,36	(0,27-6,99)	0,711
Dominante			1,18	(0,26-5,34)	0,831
Recesivo			0,76	(0,28-2,09)	0,596
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 122</b>			
Gln/Gln	28 (15,7%)	13 (10,7%)	1		
Gln/Glu	72 (40,4%)	49 (40,2%)	1,16	(0,46-2,98)	0,749
Glu/Glu	78 (43,8%)	60 (49,2%)	1,70	(0,68-4,26)	0,260
Dominante			1,53	(0,74-3,14)	0,248
Recesivo			0,81	(0,50-1,30)	0,374

### 4.3.5 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE GENES RELACIONADOS CON AUTOFAGIA Y PROGRESIÓN EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

En el caso de Thr300Ala del gen *ATG16L1*, en general, la progresión fue más rápida en los individuos portadores del genotipo Thr/Thr (30,2%) que en los individuos Thr/Met o Met/Met (14%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,013$ ) (Tabla 73).

Entre los portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  un 26,7% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Thr/Thr presentaron un progresión rápida de la enfermedad frente al 14,1% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Thr/Ala o Ala/Ala, siendo esta relación no estadísticamente significativa ( $p=0,207$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Entre los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , un 32,1% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Thr/Thr presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 13,2% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Thr/Ala o Ala/Ala, siendo esta relación estadísticamente significativa ( $p=0,021$ ).

**Tabla 73.** Distribución del gen *ATG16L1* según la progresión de Enfermedad de Alzheimer

		EA RAPIDA PROGRESION, N (%)	EA PROGRESION NORMAL, N (%)	P
<b>TOTAL</b>	Thr/Thr	13 (30,2%)	30 (69,8%)	<b>0,013</b>
	Thr/Ala-Ala/Ala	22 (14,0%)	135 (86,0%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	Thr/Thr	4 (26,7%)	11 (73,3%)	0,207
	Thr/Ala-Ala/Ala	9 (14,1%)	55 (85,9%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	Thr/Thr	9 (32,1%)	19 (67,9%)	<b>0,021</b>
	Thr/Ala-Ala/Ala	12 (13,2%)	79 (86,8%)	

Además, se realizó un análisis de regresión logística ajustado por factores clásicos que habitualmente afectan a la progresión de la Enfermedad de Alzheimer, para calcular los efectos del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE y del genotipo Thr/Thr del gen *ATG16L1* sobre la progresión rápida de la Enfermedad de Alzheimer. (Tabla 74). El análisis de estas variables determinó que la presencia de síntomas psicóticos, el tratamiento con inhibidores de la Acetilcolinesterasa (IACHÉ) o memantina, el tiempo de seguimiento y el ser portador del genotipo Thr/Thr de *ATG16L1* son factores que se relacionaron con una progresión más rápida de la enfermedad con  $p=0,006$ ,  $p=0,0001$ ,  $p=0,0001$  y  $p=0,030$  respectivamente.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Tabla 74: Análisis de regresión logística			
VARIABLE	OR	IC 95%	P
Edad al diagnóstico	0,99	0,93-1,06	0,967
Género	0,47	0,20-1,15	0,098
Educación	1,06	0,61-1,84	0,832
Depresión	0,88	0,36-2,15	0,786
Psicosis	3,62	1,44-9,13	<b>0,006</b>
Achel/memantina	2,75	1,64-4,61	<b>0,0001</b>
Tiempo de seguimiento	0,54	0,39-0,75	<b>0,0001</b>
Portador de APOE4	1,00	0,42-2,42	0,994
Genotipo Thr/Thr del gen <i>ATG16L1</i>	2,92	1,11-7,69	<b>0,030</b>

En el caso del polimorfismo intrónico del gen *ATG5*, un 17,6% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo CC presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 17,4% de formas rápidas entre aquellos con genotipos CG-GG, siendo esta relación no estadísticamente significativa ( $p = 0,978$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos de portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$  (Tabla 75).

Tabla 75. Distribución del gen <i>ATG5</i> según la progresión de Enfermedad de Alzheimer				
		EA RAPIDA PROGRESION, N (%)	EA PROGRESION NORMAL, N (%)	P
<b>TOTAL</b>	CC	16 (17,6%)	75 (82,4%)	0,978
	CG-GG	19 (17,4%)	90 (82,6%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	CC	5 (15,6%)	27 (84,4%)	0,869
	CG-GG	8 (17,0%)	39 (83,0%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	CC	11 (19,0%)	47 (81,0%)	0,713
	CG-GG	10 (16,4%)	51 (83,6%)	

Tampoco se demostró la influencia del gen *ATG5* o APOE  $\epsilon 4$  en la progresión rápida o normal de la Enfermedad de Alzheimer en el análisis de regresión logística, que confirmó –de modo similar al caso de *ATG16L1* o reparadores del DNA- que la presencia de psicosis, la toma de

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

IChE o memantina y un menor tiempo de evolución constituían variables relacionadas con la velocidad de progresión de la Enfermedad de Alzheimer ( $p < 0,05$ ) (Tabla 76).

**Tabla 76:** Análisis de regresión logística

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Edad al diagnóstico	1,01	0,95-1,08	0,745
Género	0,49	0,20-1,17	0,109
Educación	1,10	0,63-1,93	0,732
Depresión	0,92	0,38-2,21	0,857
Psicosis	3,49	1,41-8,66	<b>0,007</b>
Achel/memantina	2,85	1,71-4,76	<b>0,0001</b>
Tiempo de seguimiento	0,53	0,38-0,74	<b>0,0001</b>
Portador de APOE4	0,99	0,41-2,41	0,992
Genotipo CC del gen ATG5	1,52	0,61-3,75	0,369

En el polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10*, se observó una progresión más rápida en un 19,1% de los individuos con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Thr/Thr frente al 17% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Thr/Met-Met/Met, no alcanzándose el grado de significación estadística ( $p = 0,734$ ). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos de portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$  (Tabla 77).

**Tabla 77.** Distribución del gen *ATG10* según la progresión de Enfermedad de Alzheimer

		EA RAPIDA PROGRESION, N (%)	EA PROGRESION NORMAL, N (%)	P
<b>TOTAL</b>	Thr/Thr	9 (19,1%)	38 (80,9%)	0,734
	Thr/Met-Met/Met	26 (17,0%)	127 (83,0%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	Thr/Thr	2 (12,5%)	14 (87,5%)	0,481
	Thr/Met-Met/Met	11 (17,5%)	52 (82,5%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	Thr/Thr	6 (20,0%)	24 (80,0%)	0,696
	Thr/Met-Met/Met	15 (16,9%)	74 (83,1%)	

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

En el análisis de regresión logística, tampoco se observó una progresión más rápida en los individuos con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Thr/Thr de gen *ATG10*, no alcanzándose el grado de significación estadística ( $p > 0,05$ ) (Tabla 78).

<b>Tabla 78: Análisis de regresión logística</b>			
<b>VARIABLE</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Edad al diagnóstico</b>	1,01	0,95-1,08	0,670
<b>Género</b>	0,51	0,21-1,23	0,134
<b>Educación</b>	1,03	0,61-1,77	0,898
<b>Depresión</b>	0,92	0,39-2,22	0,868
<b>Psicosis</b>	3,42	1,39-8,42	<b>0,007</b>
<b>Achel/memantina</b>	2,82	1,70-4,70	<b>0,0001</b>
<b>Tiempo de seguimiento</b>	0,55	0,40-0,75	<b>0,0001</b>
<b>Portador de APOE4</b>	1,04	0,44-2,50	0,992
<b>Genotipo Thr/Thr del gen <i>ATG10</i></b>	0,90	0,33-2,49	0,848

En el caso del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B*, un 25,0% de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Gln/Gln presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 16,7% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Gln/Glu-Glu/Glu, siendo esta relación no estadísticamente significativa ( $p = 0,352$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos de portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$  (Tabla 79).

<b>Tabla 79. Distribución del gen <i>ATG2B</i> según la progresión de Enfermedad de Alzheimer</b>				
		<b>EA RAPIDA PROGRESION, N (%)</b>	<b>EA PROGRESION NORMAL, N (%)</b>	<b>P</b>
<b>TOTAL</b>	Gln/Gln	5 (25,0%)	15 (75,0%)	0,352
	Gln/Glu-Glu/Glu	30 (16,7%)	150 (83,3%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	Gln/Gln	2 (28,6%)	5 (71,4%)	0,324
	Gln/Glu-Glu/Glu	11 (15,3%)	61 (84,7%)	
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	Gln/Gln	3 (23,1%)	10 (76,9%)	0,411
	Gln/Glu-Glu/Glu	18 (17,0%)	88 (83,0%)	

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

En el análisis de regresión logística, no se objetivó una progresión más rápida en los individuos con Enfermedad de Alzheimer portadores del genotipo Gln/Gln del gen *ATG2B*, al no alcanzarse la significación estadística ( $p>0,05$ ) (Tabla 80).

<b>Tabla 80: Análisis de regresión logística</b>			
<b>VARIABLE</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>Edad al diagnóstico</b>	1,01	0,95-1,08	0,673
<b>Género</b>	0,52	0,22-1,23	0,136
<b>Educación</b>	1,02	0,60-1,74	0,943
<b>Depresión</b>	0,94	0,39-2,27	0,899
<b>Psicosis</b>	3,36	1,37-8,23	<b>0,008</b>
<b>Achel/memantina</b>	2,85	1,71-4,76	<b>0,0001</b>
<b>Tiempo de seguimiento</b>	0,55	0,40-0,76	<b>0,0001</b>
<b>Portador de APOE4</b>	1,03	0,43-2,48	0,941
<b>Genotipo Gln/Gln del gen <i>ATG2B</i></b>	1,57	0,43-5,69	0,491

### **4.3.6.: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Thr300Ala DEL GEN *ATG16L1* ENTRE DEMENCIA VASCULAR Y CONTROLES**

En la tabla 81 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1* en los 200 casos con Demencia Vascul ar y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Thr300Ala entre pacientes con Demencia Vascul ar y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,966$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 81:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Demencia Vascolar y controles relacionados con el polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	NDV N (%)	OR	IC del 95%	P
Codominante	Thr/Thr	40 (19,9%)	36 (18%)	1		
	Thr/Ala	99 (49,3%)	101 (50,5%)	1,12	(0,66-1,92)	0,672
	Ala/Ala	62 (30,8%)	63 (31,5%)	1,03	(0,58-1,85)	0,911
Dominante	Thr/Thr	40 (19,9%)	36 (18%)	1		
	Thr/Ala+	161 (80,1%)	164 (82%)	1,09	(0,66-1,82)	0,734
	Ala/Ala					
Recesivo	Ala/Ala	62 (30,8%)	63 (31,5%)	1		
	Thr/Thr+	139 (69,2%)	137 (68,5%)	1,05	(0,68-1,62)	0,819
	Thr/Ala					

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1*.

En la tabla 12 del Anexo VII se analizan los modelos de herencia en función de los individuos tenían una edad menor o igual a 80 años o más de 80 años. En el análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres modelos en ninguno de los dos grupos ( $p > 0,05$ ).

En la tabla 82 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ . Tras el análisis se observó que no se alcanzó la significación estadística para ninguno de los tres modelos ni en los participantes APOE  $\epsilon 4(+)$  ni en los APOE  $\epsilon 4(-)$  ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 82:** Distribución del gen *ATG16L1* entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE <math>\epsilon 4 (+)</math></b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 64</b>			
Thr/Thr	5 (21,7%)	11(17,2%)	1		
Thr/Ala	10 (43,5%)	35 (54,7%)	1,79	(0,47-6,80)	0,393
Ala/Ala	8 (34,8%)	18 (28,1%)	1,21	(0,29-5,03)	0,792
Dominante			1,55	(0,44-5,46)	0,495
Recesivo			1,26	(0,45-3,55)	0,656
<b>APOE <math>\epsilon 4 (-)</math></b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 136</b>			
Thr/Thr	35 (19,7%)	25 (18,4%)	1		
Thr/Ala	89 (50,0%)	66 (48,5%)	1,02	(0,55-1,89)	0,944
Ala/Ala	54 (30,3%)	45 (33,1%)	1,02	(0,52-1,98)	0,958
Dominante			1,03	(0,58-1,83)	0,926
Recesivo			0,99	(0,61-1,64)	0,997

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### 4.3.6.1: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Thr300Ala DEL GEN *ATG16L1* ENTRE SUBTIPOS DE DEMENCIA VASCULAR

En la tabla 83 se analizan los modelos de herencia según si la Demencia Vascular (DV) cortical o subcortical.

Dentro del subtipo de DV cortical no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al analizar los diferentes modelos de herencia ( $p > 0,05$ ).

En los pacientes con DV subcortical se apreció una tendencia de los individuos portadores del genotipo Ala/Ala en el modelo codominante a un riesgo menor (0,58 veces menor) de desarrollar la enfermedad, sin alcanzarse la significación estadística ( $p = 0,093$ ). Un resultado similar se observó en el modelo dominante, con una tendencia a un riesgo 0,69 veces menor de padecer DV subcortical para los portadores del alelo Ala (Thr/Ala+Ala/Ala) vs Thr/Thr, y en el modelo recesivo, con una tendencia a un riesgo 1,42 veces mayor de DV subcortical en sujetos portadores del alelo Thr (Thr/Thr+Thr/Ala) vs Ala/Ala, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los dos modelos ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 83:** Distribución de los genotipos del polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1* entre los subgrupos de Demencia Vascular y los casos.

Modelo	Controles N (%)	Casos DV cortical N (%)	OR	IC (95%)	p
	<b>N= 201</b>	<b>N = 99</b>			
Thr/Thr	40 (19,9%)	18 (18,2%)	1		
Thr/Ala	99 (49,3%)	54 (54,5%)	1,34	(0,71-2,52)	0,370
Ala/Ala	62 (30,8%)	27 (27,3%)	1,22	(0,60-2,46)	0,579
Dominante			1,30	(0,70-2,39)	0,403
Recesivo			1,03	(0,63-1,68)	0,902
Modelo	Controles N (%)	Casos DV subcortical N (%)	OR	IC (95%)	p
	<b>N= 201</b>	<b>N= 101</b>			
Thr/Thr	40 (19,9%)	18 (17,8%)	1		
Thr/Ala	99 (49,3%)	47 (46,5%)	0,76	(0,42-1,38)	0,370
Ala/Ala	62 (30,8%)	36 (35,6%)	0,58	(0,31-1,10)	0,093
Dominante			0,69	(0,39-1,20)	0,190
Recesivo			1,42	(0,89-2,25)	0,139

Se ha estudiado la influencia del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1* entre los diferentes subtipos de Demencia Vascular. En la tabla 84

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$  entre los pacientes con DV cortical. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres modelos ni entre los individuos portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  ni entre aquellos no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 84:** Distribución del gen *ATG16L1* entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$  en DV cortical

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE<math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 31</b>			
Thr/Thr	5 (21,7%)	4 (19,2%)	1		
Thr/Ala	10 (43,5%)	20 (64,5%)	1,19	(0,34-4,19)	0,790
Ala/Ala	8 (34,8%)	7 (22,6%)	2,31	(0,50-10,71)	0,283
Dominante			1,38	(0,41-4,69)	0,601
Recesivo			0,50	(0,17-1,49)	0,212
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Thr/Thr	35 (19,7%)	14 (20,6%)	1		
Thr/Ala	89 (50,0%)	34 (50%)	1,36	(0,63-2,95)	0,437
Ala/Ala	54 (30,3%)	20 (29,4%)	0,92	(0,40-2,13)	0,884
Dominante			1,18	(0,57-2,48)	0,652
Recesivo			1,38	(0,76-2,51)	0,290

En la tabla 85 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$  entre los pacientes con DV subcortical. En el grupo de portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres modelos de herencia ( $p > 0,05$ ).

En el grupo de los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , se apreció que los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr+Thr/Ala) vs Ala/Ala en el modelo recesivo tenían un riesgo mayor (1,75 veces mayor) de desarrollar DV subcortical, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p = 0,048$ ). Una tendencia similar se encontró al analizar el modelo codominante, en el que los individuos portadores del genotipo Ala/Ala presentaron un riesgo 0,49 veces menor de DV subcortical frente a aquellos con el genotipo Thr/Thr, no llegándose a alcanzar en este modelo el grado de significación estadística ( $p = 0,078$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 85:** Distribución del gen *ATG16L1* entre portadores y no portadores de APOE ε4 en DV subcortical

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 33</b>			
Thr/Thr	5 (21,7%)	7 (21,2%)	1		
Thr/Ala	10 (43,5%)	15 (45,5%)	0,42	(0,11-1,54)	0,191
Ala/Ala	8 (34,8%)	11 (33,3%)	0,62	(0,16-2,47)	0,501
Dominante			0,49	(0,15-1,65)	0,251
Recesivo			0,87	(0,32-2,33)	0,783
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Thr/Thr	35 (19,7%)	11 (16,2%)	1		
Thr/Ala	89 (50,0%)	32 (47,1%)	0,81	(0,39-1,69)	0,574
Ala/Ala	54 (30,3%)	25 (36,7%)	0,49	(0,22-1,08)	0,078
Dominante			0,68	(0,33-1,36)	0,272
Recesivo			1,75	(1,00-3,06)	<b>0,048</b>

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en la comparativa entre los pacientes con demencia vascular, y los subtipos de demencia vascular multiinfarto o cortical y subcortical y el grupo control. Los resultados no son estadísticamente significativos para el polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1* ni en el grupo de Demencia Vascular, ni en el subgrupo de DV cortical ni en el subgrupo de DV subcortical en su comparación con el grupo control. (Tabla 86)

**Tabla 86:** Análisis de regresión logística para Thr300Ala del gen *ATG16L1*

MODELO	GENOTIPO	DV TOTAL			DV cortical			DV subcortical		
		OR 95%)	(IC	P	OR 95%)	(IC	P	OR 95%)	(IC	P
CODOMINANTE	Thr/Thr	1			1			1		
	Thr/Ala	1,18 (0,66- 2,17)		0,571	1,31 (0,65- 2,65)		0,451	1,09 (0,53- 2,23)		0,808
	Ala/Ala	1,12 (0,60- 2,10)		0,727	1,12 (0,51- 2,45)		0,783	1,16 (0,54- 2,52)		0,704
DOMINANTE	Thr/Thr	1			1			1		
	Thr/Ala+ Ala/Ala	1,16 (0,67- 2,00)		0,595	1,24 (0,63- 2,44)		0,533	1,13 (0,57- 2,22)		0,732
RECESIVO	Ala/Ala	1			1			1		
	Thr/Ala+ Thr/Thr	1,01 (0,64- 1,61)		0,951	1,10 (0,62- 1,96)		0,738	0,92 (0,52- 1,62)		0,774

### 4.3.7: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO INTRÓNICO g.10621860 C>G DEL GEN *ATG5* ENTRE DEMENCIA VASCULAR Y CONTROLES

En la tabla 87 se resume la distribución genotípica del polimorfismo intrónico g.10621860 C>G del gen *ATG5* en los 200 casos con Demencia Vascul ar y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo intrónico del gen *ATG5* entre pacientes con Demencia Vascul ar y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,521$ ).

**Tabla 87:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Demencia Vascul ar y controles relacionados con el polimorfismo intrónico del gen *ATG5*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	NDV N (%)	OR	IC del 95%	P
Codominante	CC	82 (40,8%)	86 (43%)	1		
	CG	96 (47,8%)	90 (45%)	0,88	(0,57-1,34)	0,549
	GG	23 (11,4%)	24 (12%)	0,98	(0,51-1,89)	0,950
Dominante	CC	82 (40,8%)	86 (43%)	1		
	CG+GG	119 (59,2%)	114 (57%)	0,90	(0,60-1,34)	0,600
Recesivo	GG	23 (11,4%)	24 (12%)	1		
	CC+CG	178 (88,6%)	176 (88%)	0,95	(0,51-1,77)	0,882

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo intrónico g.10621860 C>G del gen *ATG5*.

El análisis de los genotipos en función de la edad no mostró diferencias significativas entre controles y pacientes con Demencia Vascul ar mayores de 80 años, ni en el grupo con edad igual o inferior a 80 años en el polimorfismo intrónico del gen *ATG5* estudiado ( $p>0,05$ ) [ver Anexo VII, Tabla 13].

En la tabla 88 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ . El análisis de los genotipos del polimorfismo intrónico del gen *ATG5* en función del estado de portador o no del alelo APOE  $\epsilon 4$  no mostró diferencias significativas entre controles y pacientes con Demencia Vascul ar para ninguno de los tres modelos ( $p>0,05$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 88:** Distribución del gen *ATG5* según el modelo de herencia de APOE ε4

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 64</b>			
CC	6 (26,1%)	22 (34,4%)	1		
CG	15 (65,2%)	32 (50,0%)	0,57	(0,19-1,72)	0,320
GG	2 (8,7%)	10 (15,6%)	1,41	(0,24-8,36)	0,707
Dominante			0,67	(0,23-1,96)	0,464
Recesivo			0,49	(0,10-2,46)	0,387
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 136</b>			
CC	76 (42,7%)	64 (47,1%)	1		
CG	81 (45,5%)	58 (42,6%)	0,85	(0,52-1,37)	0,498
GG	21 (11,8%)	14 (10,3%)	0,77	(0,36-1,67)	0,511
Dominante			0,83	(0,52-1,31)	0,428
Recesivo			1,19	(0,57-2,49)	0,638

### 4.3.7.1: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO INTRÓNICO DEL GEN *ATG5* ENTRE SUBTIPOS DE DEMENCIA VASCULAR

En la tabla 89 se analizan los modelos de herencia según si la Demencia Vascul ar (DV) es cortical o subcortical. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo intrónico del gen *ATG5* entre pacientes con DV cortical y controles ( $p>0,05$ ). Tampoco se alcanzó significación estadística en la comparativa entre el grupo de DV subcortical y controles para ninguno de los tres modelos ( $p>0,05$ ).

**Tabla 89:** Distribución de los genotipos del polimorfismo intrónico del gen *ATG5* entre los subgrupos de Demencia Vascul ar y los casos.

Modelo	Controles N (%)	Casos DV cortical N (%)	OR	IC (95%)	P
	N= 201	N = 99			
CC	82 (40,8%)	41 (41,4%)	1		
CG	96 (47,8%)	48 (48,5%)	0,98	(0,58-1,65)	0,949
GG	23 (11,4%)	10 (10,1%)	0,81	(0,35-1,92)	0,638
Dominante			0,95	(0,58-1,57)	0,845
Recesivo			1,22	(0,54-2,73)	0,634
Modelo	Controles N (%)	Casos DV subcortical N (%)	OR	IC (95%)	P
	N= 201	N= 101			
CC	82 (40,8%)	45 (44,6%)	1		
CG	96 (47,8%)	42 (41,6%)	0,76	(0,45-1,29)	0,311
GG	23 (11,4%)	14 (13,9%)	1,09	(0,51-2,36)	0,823
Dominante			0,83	(0,51-1,35)	0,447
Recesivo			0,80	(0,39-1,65)	0,544

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Se ha estudiado la influencia del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo intrónico del gen *ATG5* en los diferentes subtipos de Demencia Vascolar.

En la tabla 90 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$  en los pacientes con DV cortical frente al grupo control. En el grupo de portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , no se encontraron diferencias estadísticas en ninguno de los 3 modelos ( $p > 0,05$ ). En el grupo de los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , se objetiva una tendencia de los individuos portadores del genotipo GG a un riesgo menor de padecer DV cortical frente a aquellos con el genotipo CC en el modelo codominante, no alcanzándose el grado de significación estadística ( $p = 0,153$ ). Por otro lado en el modelo recesivo, se observó que los individuos portadores del alelo C (CC+CG) frente a aquellos con el genotipo GG presentaron una tendencia a un riesgo 2,29 veces mayor de padecer DV cortical, sin ser este resultado estadísticamente significativo ( $p = 0,156$ ).

**Tabla 90:** Distribución según APOE  $\epsilon 4$  del polimorfismo intrónico del gen *ATG5* en DV cortical

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	N = 31			
CC	6 (26,1%)	9 (29%)	1		
CG	15 (65,2%)	16 (51,6%)	0,76	(0,21-2,73)	0,671
GG	2 (8,7%)	6 (19,4%)	1,94	(0,28-13,53)	0,502
Dominante			0,91	(0,26-3,15)	0,881
Recesivo			0,43	(0,07-2,41)	0,335
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	N= 68			
CC	76 (42,7%)	32 (47,1%)	1		
CG	81 (45,5%)	32 (47,1%)	0,94	(0,52-1,70)	0,830
GG	21 (11,8%)	4 (5,9%)	0,42	(0,13-1,38)	0,153
Dominante			0,83	(0,47-1,47)	0,524
Recesivo			2,29	(0,73-7,18)	0,156

En la tabla 91 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$  en los pacientes con DV subcortical frente al grupo control. En los pacientes con DV subcortical no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes genotipos frente al grupo control ni en los portadores ni en los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  para ninguno de los tres modelos ( $p > 0,05$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 91:** Distribución según APOE4 del polimorfismo intrónico del gen *ATG5* en DV subcortical

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE 4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 33</b>			
CC	6 (26,1%)	13 (39,4%)	1		
CG	15 (65,2%)	16 (48,5%)	0,43	(0,13-1,48)	0,182
GG	2 (8,7%)	4 (12,1%)	1,91	(0,13-6,48)	0,924
Dominante			0,51	(0,16-1,66)	0,261
Recesivo			0,67	(0,11-4,10)	0,670
<b>APOE 4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
CC	76 (42,7%)	32 (47,1%)	1		
CG	81 (45,5%)	26 (38,2%)	0,75	(0,40-1,39)	0,363
GG	21 (11,8%)	10 (14,7%)	1,09	(0,45-2,62)	0,853
Dominante			0,82	(0,42-1,46)	0,500
Recesivo			0,80	(0,35-1,84)	0,603

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en la comparación entre los pacientes con Demencia Vascular, y los subtipos de cortical y subcortical y el grupo control. Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas para el polimorfismo intrónico del gen *ATG5* ni en el grupo de Demencia Vascular, ni en el subgrupo de DV cortical ni en el subgrupo de DV subcortical en su comparación con el grupo control. (Tabla 92)

**Tabla 92:** Análisis de correlación logística en el polimorfismo intrónico del gen *ATG5*

MODELO	GENOTIPO	DV TOTAL			DV cortical			DV subcortical	
		OR 95%)	IC 95%)	P	OR 95%)	IC 95%)	P	OR 95%)	P
CODOMINANTE	CC	1			1			1	
	CG	0,88 (0,56- 1,38)		0,582	0,96 (0,56- 1,66)		0,888	0,78 (0,45- 1,36)	0,376
	GG	1,08 (0,53- 2,18)		0,834	0,86 (0,35- 2,10)		0,739	1,19 (0,52- 2,75)	0,678
DOMINANTE	CC	1			1			1	
	CG+GG	0,92 (0,60- 1,40)		0,684	0,94 (0,56- 1,59)		0,820	0,85 (0,50- 1,44)	0,551
RECESIVO	GG	1			1			1	
	CG+CC	0,87 (0,45- 1,69)		0,682	1,14 (0,49- 2,67)		0,756	0,74 (0,34- 1,63)	0,456

### 4.3.8: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Thr212Met DEL GEN *ATG10* ENTRE DEMENCIA VASCULAR Y CONTROLES

En la tabla 93 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10* en los 200 casos con Demencia Vascul ar y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo Thr212Met entre pacientes con Demencia Vascul ar y controles ( $p>0,05$ ). Sin embargo, se observó en el modelo dominante para aquellos individuos portadores del alelo Met (Thr/Met+Met/Met) frente a los portadores del genotipo Thr/Thr una tendencia a un riesgo 1,42 veces mayor a desarrollar Demencia Vascul ar ( $p=0,139$ ) y, en el modelo codominante, de los portadores del genotipo Thr/Met vs Thr/Thr una tendencia a un riesgo 1,43 veces mayor a padecer Demencia Vascul ar ( $p=0,157$ ), sin resultar estos resultados estadísticamente significativos. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,552$ ).

**Tabla 93:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la Demencia Vascul ar y controles relacionados con el polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	Demencia Vascul ar N (%)	OR	IC del 95%	P
Codominante	Thr/Thr	58 (28,9%)	47 (23,5%)	1		
	Thr/Met	96 (47,8%)	103 (51,5%)	1,43	(0,87-2,33)	0,157
	Met/Met	47 (23,4%)	50 (25%)	1,41	(0,80-2,48)	0,240
Dominante	Thr/Thr	58 (28,9%)	47 (23,5%)	1		
	Thr/Met+Met/Met	143 (71,1%)	153 (76,5%)	1,42	(0,89-2,25)	0,139
Recesivo	Met/Met	47 (23,4%)	50 (25%)	1		
	Thr/Met+Thr/Thr	154 (76,6%)	150 (75%)	0,90	(0,57-1,43)	0,657

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10*.

El análisis de los genotipos en función de la edad no mostró diferencias significativas entre controles y pacientes con Demencia Vascul ar mayores de 80 años, ni en el grupo con edad igual o inferior a 80 años en el polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10* ( $p>0,05$ ) [ver Anexo VII, Tabla 14].

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

En la tabla 94 se analizan los modelos de herencia según si los participantes eran portadores o no del alelo APOE ε4. En el grupo de los portadores del alelo APOE ε4, los pacientes con Demencia Vascular no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes genotipos frente al grupo control ( $p>0,05$ ). En el grupo de los no portadores del alelo APOE ε4, tanto en el modelo dominante como en el codominante, los individuos portadores del alelo Met (Thr/Met+Met/Met) y del genotipo Met/Met presentan una tendencia a un riesgo 1,46 y 1,65 veces mayor, respectivamente, de padecer demencia vascular, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los modelos ( $p>0,05$ ).

**Tabla 94:** Distribución del gen *ATG10* según el modelo de herencia de APOE ε4

Modelo	Controles (N)	Casos (N)	OR	IC (95%)	P
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 64</b>			
Thr/Thr	6 (26,1%)	15 (23,4%)	1		
Thr/Met	12 (52,2%)	39 (60,9%)	1,09	(0,31-3,79)	0,893
Met/Met	5 (21,7%)	10 (15,6%)	0,67	(0,15-2,97)	0,599
Dominante			0,97	(0,30-3,16)	0,954
Recesivo			1,51	(0,45-5,11)	0,508
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 136</b>			
Thr/Thr	52 (29,2%)	32 (23,5%)	1		
Thr/Met	84 (47,2%)	64 (47,1%)	1,36	(0,77-2,39)	0,293
Met/Met	42 (23,6%)	40 (29,4%)	1,65	(0,87-3,11)	0,126
Dominante			1,46	(0,86-2,47)	0,167
Recesivo			0,74	(0,44-1,25)	0,262

### 4.3.8.1: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Thr212Met DEL GEN *ATG10* ENTRE SUBTIPOS DE DEMENCIA VASCULAR

En la tabla 95 se analizan los modelos de herencia según si la Demencia Vascular (DV) es cortical o subcortical. En el grupo de DV cortical, se observa una tendencia a un mayor riesgo de DV cortical en los sujetos portadores del genotipo Thr/Met frente a aquellos con el genotipo Thr/Thr en el modelo codominante así como de los portadores del alelo Met (Thr/Met+Met/Met) frente a aquellos con el genotipo Thr/Thr en el modelo dominante, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los modelos ( $p>0,05$ ). En el grupo de DV subcortical, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control en los diferentes genotipos del polimorfismo Thr212 Met del gen *ATG10* para ninguno de los tres modelos ( $p>0,05$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

<b>Tabla 95: Distribución Thr212Met del gen ATG10 según subtipo de Demencia Vascolar</b>					
<b>Modelo</b>	<b>Controles N (%)</b>	<b>Casos cortical N (%)</b>	<b>DVOR</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>p</b>
	<b>N= 201</b>	<b>N = 99</b>			
Thr/Thr	58 (28,9%)	23 (23,2%)	1		
Thr/Met	96 (47,8%)	53 (53,5%)	1,56	(0,85-2,89)	0,154
Met/Met	47 (23,4%)	23 (23,2%)	1,38	(0,68-2,83)	0,374
Dominante			1,50	(0,84-2,69)	0,171
Recesivo			0,98	(0,55-1,74)	0,935
<b>Modelo</b>	<b>Controles N (%)</b>	<b>Casos subcortical N (%)</b>	<b>DVOR</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>p</b>
	<b>N= 201</b>	<b>N= 101</b>			
Thr/Thr	58 (28,9%)	24 (23,8%)	1		
Thr/Met	96 (47,8%)	50 (49,5%)	1,31	(0,72-2,39)	0,377
Met/Met	47 (23,4%)	27 (26,7%)	1,42	(0,71-2,83)	0,322
Dominante			1,35	(0,76-2,37)	0,303
Recesivo			0,84	(0,48-1,48)	0,551

Se ha estudiado la influencia del alelo APOE ε4 en la distribución genotípica del polimorfismo Thr212Met del gen ATG10 en los diferentes subtipos de Demencia Vascolar.

En la tabla 96 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE ε4 en los pacientes con DV cortical y controles. En los pacientes con DV cortical no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes genotipos frente al grupo control ni en los portadores ni en los no portadores del alelo APOE ε4.

<b>Tabla 96: Distribución según APOE ε4 del polimorfismo Thr212Met del gen ATG10 en DV cortical</b>					
<b>Modelo</b>	<b>Controles N (%)</b>	<b>Casos N (%)</b>	<b>OR</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>p</b>
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N= 31</b>			
Thr/Thr	6 (26,1%)	5 (16,1%)	1		
Thr/Met	12 (52,2%)	21 (67,7%)	2,16	(0,46-10,13)	0,330
Met/Met	5 (21,7%)	5 (16,1%)	1,07	(0,16-7,18)	0,945
Dominante			1,88	(0,42-8,34)	0,406
Recesivo			1,62	(0,36-7,24)	0,531
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Thr/Thr	52 (29,2%)	18 (26,5%)	1		
Thr/Met	84 (47,2%)	32 (47,1%)	1,22	(0,61-2,47)	0,571
Met/Met	42 (23,6%)	18 (26,5%)	1,34	(0,60-2,97)	0,472
Dominante			1,26	(0,66-2,43)	0,483
Recesivo			0,85	(0,44-1,64)	0,635

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

En la tabla 97 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE ε4 en los pacientes con DV subcortical y controles. En el grupo de portadores del alelo APOE ε4, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres modelos ( $p>0,05$ ). En el grupo de los no portadores del alelo APOE ε4, se observó que los individuos portadores del genotipo Met/Met frente a aquellos con el genotipo Thr/Thr en el modelo codominante así como los portadores del alelo Met (Met/Thr+Thr/Thr) frente al genotipo Thr/Thr en el modelo dominante muestran una tendencia a un mayor riesgo de padecer DV subcortical, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los dos modelos ( $p=0,087$  y  $p=0,136$ ). Asimismo, en el modelo recesivo se observó una tendencia a un riesgo 0,65 veces menor de padecer DV subcortical para aquellos individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr+Thr/Met) frente a aquellos con el genotipo Met/Met, sin ser este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,185$ )

**Tabla 97:** Distribución según APOE ε4 del polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10* en DV subcortical

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 33</b>			
Thr/Thr	6 (26,1%)	10 (30,3%)	1		
Thr/Met	12 (52,2%)	18 (54,5%)	0,76	(0,20-2,92)	0,684
Met/Met	5 (21,7%)	5 (15,2%)	0,49	(0,09-2,62)	0,403
Dominante			0,67	(0,19-2,43)	0,542
Recesivo			1,63	(0,40-6,66)	0,493
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Thr/Thr	52 (29,2%)	14 (20,6%)	1		
Thr/Met	84 (47,2%)	32 (47,1%)	1,52	(0,73-3,19)	0,264
Met/Met	42 (23,6%)	22 (32,4%)	2,03	(0,90-4,55)	0,087
Dominante			1,69	(0,85-3,39)	0,136
Recesivo			0,65	(0,35-1,23)	0,185

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en la comparativa entre los pacientes con demencia vascular, y los subtipos cortical y subcortical y el grupo control. Aunque se reflejó una tendencia a un mayor riesgo de Demencia Vascular total en los sujetos portadores del genotipo Thr/Met y Met/Met frente a aquellos con el genotipo Thr/Thr tanto en el modelo codominante como en el dominante, los resultados no alcanzaron la significación estadística ( $p>0,05$ ). Es decir, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en el grupo de Demencia Vascular, ni en el subgrupo DV cortical ni en el subgrupo de DV subcortical en comparación con el grupo control. (Tabla 98)

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 98:** Modelo de regresión logística para el polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10*

MODELO	GENOTIPO	DV TOTAL			DV cortical			DV subcortical		
		OR 95%)	(IC 95%)	P	OR 95%)	(IC 95%)	P	OR 95%)	(IC 95%)	P
CODOMINANTE	Thr/Thr	1			1			1		
	Thr/Met	1,46 (0,86- 2,45)		0,159	1,55 (0,81- 2,96)		0,183	1,39 (0,73- 2,63)		0,318
	Met/Met	1,53 (0,84- 2,80)		0,169	1,34 (0,63- 2,86)		0,448	1,53 (0,73- 3,19)		0,256
DOMINANTE	Thr/Thr	1			1			1		
	Thr/Met+ Met/Met	1,48 (0,90- 2,42)		0,120	1,48 (0,80- 2,74)		0,211	1,43 (0,78- 2,62)		0,242
	Met/Met	1			1			1		
RECESIVO	Met/Met	1			1			1		
	Thr/Met+T hr/Thr	0,84 (0,52- 1,38)		0,499	1,02 (0,55- 1,87)		0,959	0,81 (0,45- 1,47)		0,490

### 4.3.9: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Gln1383Glu DEL GEN *ATG2B* ENTRE DEMENCIA VASCULAR Y CONTROLES

En la tabla 99 se resume la distribución genotípica del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B* en los 200 casos con Demencia Vasculuar y los 201 controles. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo Gln1383Glu entre pacientes con Demencia Vasculuar y controles. Antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,137$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 99:** Distribución de las frecuencias genotípicas en la demencia vascular y controles relacionados con el polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B*

Modelo	Genotipo	Controles (%)	NDV N (%)	OR	IC del 95%	P
<b>Codominante</b>	Gln/Gln	31 (15,4%)	26 (13%)	1		
	Gln/Glu	83 (41,3%)	78 (39%)	1,11	(0,60-2,06)	0,740
	Glu/Glu	87 (43,3%)	96 (48%)	1,36	(0,74-2,50)	0,321
<b>Dominante</b>	Gln/Gln	31 (15,4%)	26 (13%)	1		
	Gln/Glu+	170 (84,6%)	174 (87%)	1,24	(0,70-2,20)	0,464
	Glu/Glu					
<b>Recesivo</b>	Glu/Glu	87 (43,3%)	96 (48%)	1		
	Gln/Glu+	114 (56,7%)	104 (52%)	0,79	(0,53-1,19)	0,259
	Gln+Gln					

Se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B*.

El análisis de los genotipos en función de la edad se muestra en la Tabla 15 del Anexo VII. En aquellos con edad menor o igual a 80 años, no se reflejaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres modelos ( $p > 0,05$ ).

Entre los individuos mayores de 80 años, se encontró que aquellos que eran portadores del genotipo Glu/Glu presentan un riesgo 2,83 veces mayor de desarrollar Demencia Vascular frente a aquellos con el genotipo Gln/Gln en el modelo codominante, alcanzándose la significación estadística ( $p = 0,029$ ). De modo similar, se observó una tendencia a un riesgo 1,88 veces mayor de padecer Demencia Vascular en los portadores del genotipo Gln/Glu frente al genotipo Gln/Gln en el modelo codominante, así como 2,34 veces mayor en aquellos con el alelo Glu (Gln/Glu+Glu/Glu) frente al genotipo Gln/Gln en el modelo dominante, y 0,57 veces menor con el alelo Gln (Gln/Glu+Gln/Gln) frente al genotipo Glu/Glu en el modelo recesivo, sin lograrse la significación estadística ( $p = 0,195$ ;  $p = 0,061$  y  $p = 0,057$ , respectivamente).

En la tabla 100 se analizan los modelos de herencia según si los sujetos eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ .

En el grupo de portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres modelos ( $p > 0,05$ ).

En el grupo de los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , se observó que los individuos portadores de los genotipos Glu/Glu y Gln/Glu en el modelo codominante y del alelo Glu (Gln/Glu+Glu/Glu) en el modelo dominante frente a aquellos con el genotipo Gln/Gln-

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

presentan una tendencia a un riesgo mayor de padecer demencia vascular, no alcanzándose significación estadística para ninguno de los modelos ( $p=0,108$ ;  $p=0,062$  y  $p=0,066$ , respectivamente).

**Tabla 100:** Distribución del gen *ATG2B* según el modelo de herencia de APOE  $\epsilon 4$

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 64</b>			
Gln/Gln	3 (13,0%)	15 (23,4%)	1		
Gln/Glu	11 (47,8%)	19 (29,7%)	0,42	(0,09-1,89)	0,260
Glu/Glu	9 (39,1%)	30 (46,9%)	0,83	(0,18-3,78)	0,812
Dominante			0,60	(0,15-2,45)	0,476
Recesivo			0,68	(0,25-1,83)	0,447
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 178</b>			
Gln/Gln	28 (15,7%)	28 (15,7%)	1		
Gln/Glu	72 (40,4%)	72 (40,4%)	1,91	(0,87-4,21)	0,108
Glu/Glu	78 (43,8%)	78 (43,8%)	2,10	(0,96-4,57)	0,062
Dominante			2,01	(0,96-4,24)	0,066
Recesivo			0,79	(0,50-1,25)	0,322

### 4.3.9.1: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL POLIMORFISMO Gln1383Glu DEL GEN *ATG2B* ENTRE SUBTIPOS DE DEMENCIA VASCULAR

En la tabla 101 se analizan los modelos de herencia según si la Demencia Vascular es cortical o subcortical. No se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B* entre pacientes con DV cortical y controles ( $p>0,05$ ). Tampoco se alcanzó significación estadística en la comparativa entre el grupo de DV subcortical y controles para ninguno de los tres modelos ( $p>0,05$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 101:** Distribución Gln1383Glu del gen *ATG2B* según subtipo de Demencia Vascolar

Modelo	Controles N (%)	Casos cortical N (%)	DVOR	IC (95%)	p
	N= 201	N = 99			
Gln/Gln	31 (15,4%)	15 (15,2%)	1		
Gln/Glu	83 (41,3%)	40 (40,4%)	0,95	(0,45-1,98)	0,881
Glu/Glu	87 (43,3%)	44 (44,4%)	1,08	(0,52-2,23)	0,842
Dominante			1,02	(0,51-2,01)	0,961
Recesivo			0,89	(0,54-1,46)	0,652
Modelo	Controles N (%)	Casos subcortical N (%)	DVOR	IC (95%)	p
	N= 201	N= 101			
Gln/Gln	31 (15,4%)	11 (10,9%)	1		
Gln/Glu	83 (41,3%)	38 (37,6%)	1,30	(0,58-2,89)	0,520
Glu/Glu	87 (43,3%)	52 (51,5%)	1,63	(0,75-3,57)	0,219
Dominante			1,47	(0,70-3,11)	0,308
Recesivo			0,75	(0,46-1,22)	0,240

Se ha estudiado la influencia del alelo APOE  $\epsilon 4$  en la distribución genotípica del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B* en los diferentes subtipos de Demencia Vascolar.

En la tabla 102 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$  en los pacientes con DV cortical y controles. En los pacientes con DV cortical no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes genotipos frente al grupo control ni en los portadores ni en los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ .

**Tabla 102:** Distribución según APOE  $\epsilon 4$  del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B* en DV cortical

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 31</b>			
Gln/Gln	3 (13,0%)	8 (25,8%)	1		
Gln/Glu	11 (47,8%)	9 (29%)	0,41	(0,07-2,28)	0,309
Glu/Glu	9 (39,1%)	14 (45,2%)	0,83	(0,15-4,47)	0,824
Dominante			0,60	(0,12-2,90)	0,521
Recesivo			0,73	(0,24-2,24)	0,579
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Gln/Gln	28 (15,7%)	7 (10,3%)	1		
Gln/Glu	72 (40,4%)	31 (45,6%)	1,48	(0,57-3,84)	0,415
Glu/Glu	78 (43,8%)	30 (44,1%)	1,49	(0,58-3,82)	0,405
Dominante			1,50	(0,61-3,67)	0,373
Recesivo			0,92	(0,51-1,63)	0,768

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

En la tabla 103 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$  en los pacientes con DV subcortical y controles.

Entre los pacientes con DV subcortical, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control en los diferentes genotipos del polimorfismo Q1383E al analizar exclusivamente a aquellos individuos portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, entre los sujetos no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  se apreció que la presencia de los genotipos Gln/Glu y Glu/Glu en el modelo codominante y del alelo Glu (Gln/Glu + Glu/Glu) en el modelo dominante frente al genotipo Gln/Gln muestran una tendencia a un riesgo mayor (2,68 veces mayor para Gln/Glu y 3,05 para Glu/Glu en el modelo codominante y 2,88 en el modelo dominante) de padecer la enfermedad, aunque sin alcanzarse el grado de significación estadística ( $p = 0,091$ ;  $p = 0,053$  y  $p = 0,059$ , respectivamente).

**Tabla 103:** Distribución según APOE  $\epsilon 4$  del polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B* en DV subcortical

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (+)</b>	<b>N= 23</b>	<b>N = 33</b>			
Gln/Gln	3 (13,0%)	7 (21,2%)	1		
Gln/Glu	11 (47,8%)	10 (30,3%)	0,42	(0,08-2,25)	0,313
Glu/Glu	9 (39,1%)	16 (48,5%)	0,81	(0,15-4,32)	0,809
Dominante			0,59	(0,13-2,82)	0,511
Recesivo			0,68	(0,22-2,04)	0,486
<b>APOE <math>\epsilon 4</math> (-)</b>	<b>N= 178</b>	<b>N= 68</b>			
Gln/Gln	28 (15,7%)	4 (5,9%)	1		
Gln/Glu	72 (40,4%)	28 (41,2%)	2,68	(0,85-8,44)	0,091
Glu/Glu	78 (43,8%)	36 (52,9%)	3,05	(0,99-9,46)	0,053
Dominante			2,88	(0,96-8,64)	0,059
Recesivo			0,73	(0,41-1,29)	0,274

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en la comparación entre los pacientes con Demencia Vasculare, y los subtipos cortical y subcortical y el grupo control. Al realizar el análisis de regresión logística, los resultados no reflejaron diferencias estadísticamente significativas ni en el grupo de Demencia Vasculare, ni en el subgrupo de DV cortical ni en el subgrupo de DV subcortical en comparación con el grupo control. (Tabla 104)

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 104:** Modelo de regresión logística para el polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B*

MODELO	GENOTIPO	DV TOTAL		DV CORTICAL			DV SUBCORTICAL		
		OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	(IC	P	OR (IC 95%)	(IC	P
CODOMINANTE	Gln/Gln	1		1			1		
	Gln/Glu	1,09 (0,57-2,09)	0,79 1	0,87 (0,40-1,88)		0,726	1,44 (0,62-3,35)		0,399
	Glu/Glu	1,37 (0,72-2,61)	0,33 2	1,01 (0,47-2,15)		0,989	1,72 (0,75-3,94)		0,198
DOMINANTE	Gln/Gln	1		1			1		
	Gln/Glu+ Glu/Glu	1,24 (0,68-2,26)	0,49 3	0,94 (0,46-1,92)		0,870	1,59 (0,72-3,49)		0,252
RECESIVO	Glu/Glu	1		1			1		
	Gln/Glu+ Gln/Gln	0,78 (0,51-1,19)	0,24 6	0,90 (0,54-1,51)		0,689	0,76 (0,45-1,28)		0,303

### 5. ANÁLISIS GENÉTICO DEL POLIMORFISMO Arg2Pro DEL GEN *TP53*

El estudio del polimorfismo Arg72Pro del gen *TP53* es una ampliación de un estudio previo realizado por nuestro equipo. En dicho estudio, se observaron resultados preliminares prometedores; por esta razón hemos decidido ampliar la muestra para analizar si se replican los resultados.

#### 5.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA EMPLEADA PARA EL ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN *TP53*

Para la realización de este trabajo, tal y como se ha comentado en el apartado anterior se han empleado un total de 217 casos con Enfermedad de Alzheimer, 208 casos con Demencia Vasculare y 214 controles. Entre los casos de Demencia Vasculare 102 casos eran de gran vaso (cortical) y 106 de pequeño vaso (subcortical). Respecto a los pacientes con Enfermedad de Alzheimer 39 presentaron una rápida progresión y 178 una evolución normal de la sintomatología.

Los resultados obtenidos al analizar las variables epidemiológicas, así como las características de la demencia fueron similares a las obtenidas en e estudio de la población en relación con los genes reparadores de DNA, autofagia y polimorfismo Met129Val de la proteína priónica y se encuentran resumidas en el Anexo VIII.

## 5.2 ANÁLISIS GENÉTICO DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN TP53

En relación al gen *TP53*, se estudió el polimorfismo Arg72Pro. Este polimorfismo se localiza en el exón 4, y produce un cambio de Arginina (Arg) por Prolina (Pro), lo que da lugar a tres posibles genotipos; Arg/Arg, Pro/Pro, Arg/Pro. Las funciones de dicho polimorfismo se detallan en el capítulo 1.

En este polimorfismo, antes de realizar el análisis de asociación y con el fin de observar si el grupo de controles puede considerarse representativo de la población general sin demencia, se ha comprobado que se cumple el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ( $p=0,525$ ).

### 5.2.1 ESTUDIO COMPARATIVO DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN TP53 ENTRE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y CONTROLES

En la tabla 105 se analiza el riesgo del polimorfismo Arg72Pro del gen *TP53* según el modelo de herencia en Enfermedad de Alzheimer, apreciándose que tanto los individuos homocigotos para Pro en el modelo codominante como los portadores de al menos un alelo Pro (homo y heterocigotos) en el dominante presentan una disminución del riesgo de tener Enfermedad de Alzheimer, 0,62 veces menor en el caso del codominante y 0,56 veces menor en el dominante, y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,037$ ;  $p=0,008$ ).

El modelo recesivo muestra que los individuos portadores del alelo Arg (Arg/Arg + Arg/Pro) tienen un riesgo aumentado de tener demencia tipo Alzheimer, prácticamente el triple (2,96), frente a los homocigotos para Pro (Pro/Pro), alcanzando la significación estadística ( $p=0,027$ ).

Tabla 105: Análisis del riesgo del polimorfismo Arg72Pro del gen <i>TP53</i> en función del modelo de herencia						
Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Alzheimer N (%)	OR	IC del 95%	P
Codominante	Arg/Arg	117 (54,7%)	143 (65,9%)	1		
	Arg/Pro	80 (37,4%)	65 (30%)	0,62	(0,39-0,97)	<b>0,037</b>
	Pro/Pro	17 (7,9%)	9 (4,1%)	0,27	(0,10-0,73)	<b>0,010</b>
Dominante	Arg/Arg	117 (54,7%)	143 (65,9%)	1		
	Arg/Pro + Pro/Pro	97 (45,3%)	74 (34,1%)	0,56	(0,36-0,86)	<b>0,008</b>
	Pro/Pro	17 (7,9%)	9 (4,1%)	1		
Recesivo	Pro/Pro	17 (7,9%)	9 (4,1%)	1		
	Arg/Arg + Arg/Pro	197 (92,1%)	208 (95,9%)	2,96	(1,13-7,6)	<b>0,027</b>

Estos hallazgos nos permiten concluir que los portadores del alelo Pro tienen disminuido el riesgo de padecer Enfermedad de Alzheimer, y que ello sucede independientemente de la edad y del género.

Por otro lado, se ha estudiado la influencia de la variable edad así como del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE en la distribución genotípica del polimorfismo Arg72 Pro del gen *TP53*.

El análisis de los genotipos en función de la edad mostró que, tanto en individuos con edad menor o igual a 80 años como en mayores de 80 años la presencia del alelo Pro en el modelo dominante supone un riesgo 0,52 y 0,26 veces menor respectivamente de tener demencia tipo Alzheimer, aunque sólo en el caso de grupo de  $\leq 80$  años se alcanza significación estadística ( $p=0,030$ ;  $p=0,080$ ) [ver Anexo VII, Tabla 16].

En la tabla 106 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ .

Entre los pacientes portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la comparativa entre los grupos Enfermedad de Alzheimer y control de los diferentes genotipos del polimorfismo Arg72Pro ( $p>0,05$ ).

Entre los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  se observó que los individuos portadores de los genotipos Arg/Pro y Pro/Pro del polimorfismo Arg72Pro, tanto en el modelo de herencia codominante como en el dominante, tenían un riesgo menor de padecer Enfermedad de Alzheimer (de 0,56 en los portadores del genotipo Arg/Pro y de 0,19 en aquellos con el genotipo Pro/Pro para el modelo codominante y de 0,49 para los genotipos Arg/Pro + Pro/Pro en el dominante), siendo en los tres casos esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,024$ ;  $p=0,007$ ;  $p=0,004$ ). En el modelo recesivo, los individuos portadores del alelo Arg (Arg/Arg + Arg/Pro) tienen un riesgo aumentado de tener Enfermedad de Alzheimer (4,26 veces más) frente a los homocigotos para Pro (Pro/Pro), alcanzando la significación estadística ( $p=0,017$ ).

**Tabla 106:** Distribución del Arg72Pro entre portadores y no portadores de APOE ε4

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 24</b>	<b>N = 83</b>			
Arg/Arg	15 (62,5%)	50 (60,2%)	1		
Arg/Pro	8 (33,3%)	28 (33,7%)	1,03	(0,37-2,89)	0,946
Pro/Pro	1 (4,2%)	5 (6%)	0,81	(0,07-9,30)	0,868
Dominante			1,01	(0,37-2,72)	0,978
Recesivo			1,25	(0,11-13,94)	0,856
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 190</b>	<b>N= 134</b>			
Arg/Arg	102 (53,7%)	93 (69,4%)	1		
Arg/Pro	72 (37,9%)	37 (27,6%)	0,56	(0,34-0,92)	<b>0,024</b>
Pro/Pro	16 (8,4%)	4 (3%)	0,19	(0,05-0,64)	<b>0,007</b>
Dominante			0,49	(0,30-0,79)	<b>0,004</b>
Recesivo			4,26	(1,29-14,02)	<b>0,017</b>

### 5.2.2 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN TP53 Y PROGRESIÓN EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

También se analizó la influencia del polimorfismo Arg72Pro en la progresión rápida o normal de la Enfermedad de Alzheimer. Se definió como progresión rápida la disminución en puntuación MMSE  $\geq$  4,5 puntos al año.

En general, la progresión fue más rápida en los individuos Arg/Arg (21,4%) que en los individuos Arg/Pro o Pro/Pro (9,5%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,019$ ).

Entre los portadores del alelo APOE ε4 un 20% de los pacientes con EA portadores del genotipo Arg/Arg presentaron un progresión rápida de la enfermedad frente al 12,1% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Arg/Pro-Pro/Pro, siendo esta relación no estadísticamente significativa ( $p=0,348$ ).

Entre los no portadores del alelo APOE ε4, un 23,7% de los pacientes con EA portadores del genotipo Arg/Arg presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 7,3% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Arg/Pro-Pro/Pro, siendo esta relación estadísticamente significativa ( $p=0,025$ ). (Tabla 107)

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 107.** Distribución del gen *TP53* según la progresión de EA

		EA RAPIDA PROGRESION, N (%)	EA PROGRESION NORMAL, N (%)	P
<b>TOTAL</b>	Arg/Arg	32 (21,4%)	111 (77,6%)	<b>0,019</b>
	Arg/Pro-Pro/Pro	7 (9,5%)	67 (90,5%)	
<b>APOE ε4 (+)</b>	Arg/Arg	10 (20,0%)	40 (80%)	0,348
	Arg/Pro-Pro/Pro	4 (12,1%)	29 (87,9%)	
<b>APOE ε4 (-)</b>	Arg/Arg	22 (23,7%)	71 (76,3%)	<b>0,025</b>
	Arg/Pro-Pro/Pro	3 (7,3%)	38 (92,7%)	

Asimismo, se realizó un análisis de regresión logística ajustado por factores clásicos que habitualmente afectan a la progresión de la Enfermedad de Alzheimer, para calcular los efectos del alelo ε4 del polimorfismo APOE ε4 y del genotipo Arg/Arg del gen *TP53* sobre la progresión rápida de la Enfermedad de Alzheimer. El análisis de estas variables determinó que la presencia de síntomas psicóticos, el tratamiento con inhibidores de la Acetilcolinesterasa (IChE) o memantina, el tiempo de seguimiento y el ser portador del genotipo Arg/Arg del gen *TP53* son factores que se relacionaron con una progresión más rápida de la enfermedad con  $p=0,007$ ,  $p=0,0001$ ,  $p=0,0001$  y  $p=0,004$  respectivamente. (Tabla 108)

**Tabla 108:** Análisis de regresión logística de diferentes variables independientes

VARIABLE	OR	IC 95%	P
Edad al diagnóstico	1,02	0,96-1,09	0,465
Género	0,53	0,22-1,27	0,157
Educación	0,96	0,56-1,66	0,901
Depresión	1,04	0,44-2,47	0,917
Psicosis	3,57	1,41-9,05	<b>0,007</b>
IChE/memantina	3,31	1,94-5,64	<b>0,0001</b>
Tiempo de seguimiento	0,46	0,33-0,64	<b>0,0001</b>
Portador de APOE ε4	0,62	0,25-1,52	0,299
Genotipo Arg/Arg del gen <i>TP53</i>	4,64	1,65-13,02	<b>0,004</b>

### 5.2.3 ESTUDIO COMPARATIVO DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN TP53 ENTRE DEMENCIA VASCULAR Y CONTROLES

En la tabla 109 se analiza el riesgo del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 según el modelo de herencia en Demencia Vascular, apreciándose que en el modelo dominante los individuos portadores de al menos un alelo Pro (homo y heterocigotos) presentan una disminución del riesgo de tener demencia vascular, 0,63 veces menor y con significación estadística ( $p=0,026$ ) tras corrección por sexo y edad. Asimismo, los individuos heterocigotos Arg/Pro presentaron un riesgo 0,65 veces menor de padecer demencia vascular frente aquellos portadores del genotipo homocigoto Arg/Arg en el modelo codominante ( $p=0,044$ ).

**Tabla 109:** Análisis del riesgo del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 en función del modelo de herencia

Modelo	Genotipo	Controles N (%)	Demencia Vascular N (%)	OR	IC del 95%	P
<b>Codominante</b>	Arg/Arg	117 (54,7%)	143 (65,9%)	1		
	Arg/Pro	80 (37,4%)	65 (30%)	0,65	(0,42-0,99)	<b>0,044</b>
	Pro/Pro	17 (7,9%)	9 (4,1%)	0,57	(0,25-1,28)	0,172
<b>Dominante</b>	Arg/Arg	117 (54,7%)	143 (65,9%)	1		
	Arg/Pro +Pro/Pro	97 (45,3%)	74 (34,1%)	0,63	(0,42-0,95)	<b>0,026</b>
	Pro/Pro	17 (7,9%)	9 (4,1%)	1		
<b>Recesivo</b>	Arg/Arg +Arg/Pro	197 (92,1%)	208 (95,9%)	1,50	(0,68-3,30)	0,316
	Pro/Pro	17 (7,9%)	9 (4,1%)	1		

Estos hallazgos nos permiten concluir que los portadores del alelo Pro tienen disminuido el riesgo de padecer demencia vascular, y que ello sucede independientemente de la edad y del género.

Por otro lado, se estudió la influencia de la edad y, por otro, del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE en la distribución genotípica del polimorfismo Arg72Pro.

El análisis de los genotipos en función de la edad mostró una tendencia hacia la disminución del riesgo de tener Demencia Vascular en los individuos portadores del alelo Pro (Arg/Pro + Pro/Pro) del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53, tanto en aquellos con edad menor o igual a 80 años como en los mayores de 80 años, sin alcanzarse el grado de significación estadística ( $p>0,05$ ). [ver Anexo VII, Tabla 17].

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

En la tabla 110 se analizan los modelos de herencia según si los pacientes eran portadores o no del alelo APOE ε4.

Entre los pacientes portadores del alelo APOE ε4 no se observaron diferencias estadísticamente significativas de los diferentes genotipos del polimorfismo Arg72Pro en la comparativa entre los grupos DV y control ( $p > 0,05$ ).

Entre los pacientes no portadores del alelo APOE ε4 se observó que tanto los individuos con el genotipo Pro/Pro en el modelo codominante como los portadores del alelo Pro en el dominante presentan un riesgo menor de tener Demencia Vascular (0,25 veces menor en el caso del codominante y 0,57 veces menor en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p = 0,020$ ;  $p = 0,016$ ). En el modelo recesivo los individuos portadores del alelo Arg (Arg/Arg+ Arg/Pro) tienen un riesgo aumentado de tener Demencia Vascular (3,38 veces mayor) frente a los homocigotos para Pro (Pro/Pro), alcanzando la significación estadística ( $p = 0,039$ ).

**Tabla 110:** Distribución del Arg72Pro entre portadores y no portadores de APOE ε4

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 24</b>	<b>N = 66</b>			
Arg/Arg	15 (62,5%)	39 (59,1%)	1		
Arg/Pro	8 (33,3%)	19 (28,8%)	0,75	(0,25-2,25)	0,613
Pro/Pro	1 (4,2%)	8 (12,1%)	3,11	(0,35-27,79)	0,310
Dominante			1,02	(0,37-2,79)	0,973
Recesivo			0,30	(0,03-2,60)	0,275
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 190</b>	<b>N= 142</b>			
Arg/Arg	102 (53,7%)	94 (66,2%)	1		
Arg/Pro	72 (37,9%)	44 (31%)	0,64	(0,39-1,03)	0,066
Pro/Pro	16 (8,4%)	4 (2,8%)	0,25	(0,08-0,80)	<b>0,020</b>
Dominante			0,57	(0,36-0,90)	<b>0,016</b>
Recesivo			3,38	(1,06-10,71)	<b>0,039</b>

### 5.2.3.1 ESTUDIO COMPARATIVO DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN TP53 ENTRE SUBTIPOS DE DEMENCIA VASCULAR

En la tabla 111 se analizan el riesgo del polimorfismo Arg72Pro del gen TP53 según el modelo de herencia para cada subtipo de Demencia Vascular (DV).

En los pacientes con DV cortical se apreció que los individuos portadores del alelo Pro (Arg/Pro + Pro/Pro) en el modelo dominante tenían un riesgo menor (0,59 veces menor) de desarrollar la enfermedad, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p = 0,039$ ).

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Dentro del subtipo de DV subcortical no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al analizar los diferentes modelos de herencia.

**Tabla 111:** Análisis del riesgo del polimorfismo Arg72Pro del gen *TP53* en función del modelo de herencia

Modelo	Controles N (%)	Casos DV cortical N (%)	OR	IC (95%)	p
	<b>N= 214</b>	<b>N = 102</b>			
Arg/Arg	117 (54,7%)	67 (65,7%)	1		
Arg/Pro	80 (37,4%)	32 (31,4%)	0,65	(0,39-1,10)	0,110
Pro/Pro	17 (7,9%)	3 (2,9%)	0,29	(0,08-1,03)	0,056
Dominante			0,59	(0,36-0,97)	<b>0,039</b>
Recesivo			3,00	(0,84-10,68)	0,089
Modelo	Controles N (%)	Casos DV subcortical N (%)	OR	IC (95%)	p
	<b>N= 214</b>	<b>N= 106</b>			
Arg/Arg	117 (54,7%)	65 (62,3%)	1		
Arg/Pro	80 (37,4%)	31 (29,2%)	0,64	(0,38-1,08)	0,092
Pro/Pro	17 (7,9%)	9 (8,5%)	0,85	(0,35-2,07)	0,723
Dominante			0,68	(0,42-1,10)	0,115
Recesivo			1,00	(0,42-2,37)	0,995

Por otro lado, también se estudió la influencia del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE en la distribución genotípica del polimorfismo Arg72Pro en los diferentes subtipos de Demencia Vascular.

Entre los pacientes con DV cortical no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes genotipos frente al grupo control ni en los portadores ni en los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ . (Tabla 112)

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

**Tabla 112:** Distribución del Arg72Pro entre portadores y no portadores de APOE4 en DV cortical

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 24</b>	<b>N = 32</b>			
Arg/Arg	15 (62,5%)	21 (65,6%)	1		
Arg/Pro	8 (33,3%)	9 (28,1%)	0,68	(0,20-2,33)	0,535
Pro/Pro	1 (4,2%)	2 (6,3%)	1,49	(0,12-18,49)	0,755
Dominante			0,78	(0,24-2,49)	0,676
Recesivo			0,61	(0,05-7,33)	0,699
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 190</b>	<b>N= 70</b>			
Arg/Arg	102 (53,7%)	46 (65,7%)	1		
Arg/Pro	72 (37,9%)	23 (32,9%)	0,69	(0,38-1,25)	0,218
Pro/Pro	16 (8,4%)	1 (1,4%)	0,13	(0,02-1,06)	0,057
Dominante			0,59	(0,33-1,05)	0,075
Recesivo			6,51	(0,83-51,32)	0,075

Entre los pacientes con DV subcortical, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control en los diferentes genotipos del polimorfismo Arg72Pro al analizar exclusivamente a aquellos individuos portadores del alelo APOE ε4. Sin embargo, entre los sujetos no portadores del alelo APOE ε4 se apreció que la presencia del alelo Pro (Arg/Pro + Pro/Pro) en el modelo dominante se relaciona con un riesgo menor (0,55 veces menor) de padecer la enfermedad, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,041$ ) (Tabla 113)

**Tabla 113:** Distribución del Arg72Pro entre portadores y no portadores de APOE4 en DV subcortical

Modelo	Controles N (%)	Casos N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>APOE ε4 (+)</b>	<b>N= 24</b>	<b>N = 34</b>			
Arg/Arg	15 (62,5%)	18 (52,9%)	1		
Arg/Pro	8 (33,3%)	10 (29,4%)	0,85	(0,25-2,91)	0,791
Pro/Pro	1 (4,2%)	6 (17,6%)	4,95	(0,52-47,36)	0,165
Dominante			1,29	(0,42-3,96)	0,656
Recesivo			0,19	(0,02-1,78)	0,147
<b>APOE ε4 (-)</b>	<b>N= 190</b>	<b>N= 70</b>			
Arg/Arg	102 (53,7%)	48 (66,7%)	1		
Arg/Pro	72 (37,9%)	21 (29,2%)	0,59	(0,32-1,08)	0,088
Pro/Pro	16 (8,4%)	3 (4,2%)	0,35	(0,09-1,31)	0,119
Dominante			0,55	(0,31-0,98)	<b>0,041</b>
Recesivo			2,34	(0,64-8,55)	0,198

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en los pacientes con Demencia Vascular, y los subtipos cortical y subcortical frente al grupo control. Al realizar el análisis de regresión logística, considerando el genotipo Arg/Arg de referencia, (Tabla 114) se observó que en el modelo codominante en el grupo de Demencia Vascular total así como en los modelos dominantes del grupo DV total y DV cortical ser portador del alelo Pro se relaciona con un riesgo menor (0,63; 0,62 y 0,58 respectivamente) de padecer la enfermedad, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,045$ ;  $p=0,028$  y  $p=0,038$  respectivamente).

**Tabla 114:** Análisis de regresión logística para Arg72Pro del gen *TP53*

MODELO	GENOTIPO	DV TOTAL		DV cortical		DV subcortical	
		OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	P
CODOMINANTE	Arg/Arg	1		1		1	
	Arg/Pro	0,63 (0,40-0,99)	<b>0,045</b>	0,64 (0,37-1,10)	0,105	0,62 (0,36-1,08)	0,092
	Pro/Pro	0,58 (0,24-1,36)	0,210	0,28 (0,08-1,06)	0,062	0,90 (0,35-2,33)	0,822
DOMINANTE	Arg/Arg	1		1		1	
	Arg/Pro + Pro/Pro	0,62 (0,40-0,95)	<b>0,028</b>	0,58 (0,34-0,97)	<b>0,038</b>	0,67 (0,40-1,11)	0,122
RECESIVO	Pro/Pro	1		1		1	
	Arg/Arg + Arg/Pro	1,46 (0,63-3,40)	0,377	2,98 (0,81-10,95)	0,101	0,94 (0,37-2,38)	0,889

## **CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN**

## **CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN**

### **1. ASPECTOS GENERALES**

El incremento en la esperanza de vida, sumado a la baja tasa de natalidad de algunos países está originando un crecimiento acelerado en el porcentaje de personas mayores, y, como consecuencia, un envejecimiento poblacional.

Este envejecimiento tiene consecuencias a nivel social, económico y fundamentalmente sanitario, ya que se acompaña de un aumento de la prevalencia de enfermedades tales como las demencias.

La demencia plantea uno de los mayores retos de salud pública, lo cual ha favorecido que se hayan aumentado los estudios epidemiológicos, genéticos y sobre tratamiento en los últimos años.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la primera causa de demencia en todo el mundo, seguida de la Demencia Vascular (DV). Sin embargo, a pesar de la alta incidencia de DV, los estudios sobre esta enfermedad son escasos y todavía se desconocen muchos aspectos de la misma.

En nuestro trabajo hemos estudiado la influencia de diferentes factores de riesgo, las características clínicas y varios polimorfismos genéticos relacionados con la autofagia, la apoptosis y la reparación celular en el desarrollo de EA y DV, y con la proteína priónica en EA.

### **2. ESTUDIO CLÍNICO**

#### **2.1: ESTUDIO DE VARIABLES NO GENÉTICAS. INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN EL DESARROLLO DE LA DEMENCIA**

La muestra de pacientes con demencia tipo Alzheimer incluida en nuestro estudio tiene una distribución por sexos similar a la de las series publicadas, con predominio de las mujeres respecto a los hombres. Sin embargo, en DV la distribución de la enfermedad entre hombres y mujeres es similar lo cual difiere en lo publicado hasta la fecha, ya que habitualmente se suele observar un predominio de varones en esta entidad. (Tabla 11)

En un metanálisis realizado por Sujuan Gao y Cols. se recogieron 67 estudios sobre la incidencia, la edad y el sexo en la EA, observándose en todos ellos que las mujeres tenían

mayor incidencia respecto a los varones. (144) Estos resultados también se observaron en el estudio EURODEM, donde se observó que el género femenino aumentaba el riesgo de desarrollar EA a medida que aumentaba la edad. (145)

Respecto a la DV, en el estudio EURODEM, no parecía observarse diferencias significativas entre la edad, el género y la probabilidad de desarrollar DV. (145) Recientemente, el estudio realizado por Borenstein y cols, denominado proyecto Kame, determinó que las mujeres entre 80-89 años presentaban mayor incidencia de DV que los varones. (146) En el estudio Rotterdam la incidencia de DV fue mayor en los varones, disminuyendo las diferencias en los grupos de mayor edad. (147)

En los registros españoles, como el del estudio ReDeGi, se observó una mayor frecuencia de mujeres en la categoría de EA y mayor frecuencia de hombres en las categorías de DV. (148)

La mayor incidencia y prevalencia de EA en el género femenino puede deberse a varias causas, entre las que se encuentran la mayor supervivencia media de las mujeres, así como factores genéticos. Sin embargo, una diferencia fundamental es la pérdida del efecto neuroprotector de los estrógenos en las mujeres. El efecto protector de los estrógenos es bien conocido ya que éstos ejercen numerosas funciones sobre las neuronas, tales como reducir la pérdida neuronal, estimular las vías colinérgicas o favorecer la formación de espinas neuronales. A diferencia de los hombres, que mantienen tasas de estrógenos más o menos estables durante toda la vida, las mujeres, debido a la menopausia, presentan una caída brusca de los niveles de estrógenos que se traduce en diferentes alteraciones del metabolismo cerebral. (149) En 2007, la clínica Mayo llevó a cabo un estudio de cohortes para analizar los efectos de la ooforectomía y el envejecimiento, demostrando que las mujeres que fueron sometidas a ooforectomías bilaterales antes del inicio de la menopausia experimentaban mayor riesgo a largo plazo de deterioro cognitivo y/o demencia. (150,151) A pesar de ello, no se ha demostrado que la terapia hormonal sustitutiva (THS) sea beneficiosa; es más, el ensayo clínico WHIMS estableció que la THS doblaba el riesgo de demencia de cualquier causa. (149)

La inflamación es otro factor de riesgo para EA que varía según el sexo, siendo la disregulación inflamatoria más fuerte en las mujeres. Las investigaciones preclínicas sugieren diferencias importantes según el género en la microglía durante el desarrollo y en respuesta a los esteroides gonadales fluctuantes a lo largo de la vida. Se ha demostrado que las mujeres tienen más microglía que los hombres, especialmente durante la adolescencia, tiempo en el que trastornos como la depresión y la ansiedad son más prevalentes en las mujeres. Se ha

determinado que la interrupción en la microglía establece el escenario para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en la vejez. (152)

Respecto a la DV, en general, la mayoría de estudios coincide en una mayor prevalencia masculina. Esto podría explicarse por el hecho de que clásicamente los factores de riesgo para enfermedad cerebrovascular eran más prevalentes en varones debido, fundamentalmente a sus hábitos. Así en el estudio NEDICES se observó que padecer un ictus y el género masculino eran factores de riesgo independientes para DV. (153) En nuestro estudio, tanto para la DV como para sus subtipos se observaron porcentajes similares entre hombres y mujeres. Esto podría ser porque en las últimas décadas las mujeres han adoptado estilos de vida y costumbres similares a los hombres, equiparándose de este modo los factores de riesgos y como consecuencia, el riesgo de enfermedad vascular cerebral.

Respecto a la diferencia de género entre los diferentes subtipos de DV se observaron porcentajes similares entre hombres y mujeres tanto para la DV cortical como para DV subcortical, sin encontrarse diferencias significativas respecto al grupo control. (Tabla 12) En la literatura existen muy pocos estudios que analicen las diferencias por género según el subtipo de demencia vascular y en lo publicado se ha observado un mayor porcentaje de varones en la DV cortical que en la subcortical. (154).

Sobre la progresión en EA, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en el grupo de rápida progresión. (Tabla 13) Varios estudios epidemiológicos muestran que la neurodegeneración y los síntomas clínicos ocurren más rápidamente en las mujeres una vez que se sospecha el diagnóstico. Diversos investigadores han hipotetizado que esto sucede debido a una mayor esperanza de vida femenina así como a una progresión más rápida debido a la vulnerabilidad neurobiológica en la posmenopausia. (152) Aunque la progresión de la enfermedad puede ser más rápida entre las mujeres de edad avanzada, estudios realizados en los Estados Unidos y el Reino Unido sugieren que los varones con EA tienen un tiempo de supervivencia más corto. (155,156)

La edad media de los sujetos incluidos en el estudio fue de 79,7 años para el grupo de EA, de 79,3 años para el grupo de DV y de 81 años para el grupo control. (Tabla 14)

En el grupo control sólo se incluyeron sujetos > de 70 años, para disminuir la probabilidad de incluir sujetos que pudieran desarrollar demencia en un futuro; ya que uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la demencia es la edad. Este sesgo de selección puede

ser la explicación a que las diferencias encontradas entre los diferentes grupos de edad fueran estadísticamente significativas.

Al analizar la distribución por rangos de edad observamos que entre los 76-85 en el grupo de EA y entre los 71-80 en el grupo de DV casi se duplica de forma exponencial el número de sujetos incluidos en cada quinquenio; estando la mayor parte de los sujetos en el rango comprendido entre el rango de edad entre los 81-85 años de edad para EA y entre los 76-80 para DV. En los grupos de mayor edad tanto los sujetos con EA como los de DV, van disminuyendo de forma progresiva. La tendencia observada en nuestro estudio, es comparable a la observada en otras poblaciones europeas (145).

Si atendemos a los subtipos de DV, observamos que la DV subcortical tiene un comportamiento similar al de la EA, ya que en el grupo de DV subcortical el mayor número de pacientes se encuentra entre los 81 y 85 años de edad, factor que podría explicarse por la mayor presencia de mujeres en ambos grupos. Por otro lado, en el grupo de DV cortical el mayor número de pacientes se encuentra entre los 76-80 años. (Tabla 15)

En un estudio llevado a cabo por Jellinger y cols, en el que se estudió la incidencia y prevalencia de la demencia vascular, se evaluaron cuatro grupos de edad (desde la séptima hasta la décima década) y se observó que la DV se producía en el 12,3% de la cohorte total, disminuyendo entre los 60 y 90 años de 15 a 8,7%. Los subtipos morfológicos (encefalopatía arterioesclerótica subcortical, encefalopatía por infarto múltiple y demencia por infarto estratégico) no mostraron diferencias relacionadas con la edad. (157)

Si analizamos los pacientes con EA, la edad media entre los de rápida progresión fue de 79,4 años, mientras que la edad media entre los de progresión normal fue de 79,7 años; es decir, que las edades medias de inicio fueron similares a las del grupo global de EA.

En relación con el nivel educativo, se observó un menor nivel educativo, en general, en los grupos de DV y EA, pero estos resultados sólo fueron estadísticamente significativos respecto a los controles en el grupo de DV.

Varios estudios han demostrado que el nivel educativo bajo se asocia con una peor función cognitiva en la edad adulta, así como con mayor riesgo de desarrollar demencia. Algunos estudios han determinado, incluso, que el efecto del nivel educativo podría ser más importante en el desarrollo de demencia que ser portador de genotipo APOE ε4. (158)

En un reciente metanálisis de 31 estudios sobre EA, se estableció un riesgo relativo (RR) de 1,99 (IC del 95%: 1,30-3,04) para los pacientes con nivel educativo bajo. (158) Estos resultados también se observaron en otro metanálisis que incluyó 69 estudios, donde estableció un RR de 2,62 para EA (IC 95%: 2,06-3,33) y de 2,11 (IC 95%: 1,40-3,19) para la DV. (159)

Se han propuesto diversos mecanismos que expliquen la repercusión del nivel educativo en el riesgo de desarrollar demencia. Una de las principales hipótesis, establece que la educación en edades tempranas tiene un efecto directo sobre el cerebro ya que estimula un mayor número de sinapsis así como una mejor vascularización lo cual ayuda a la creación de la denominada “reserva cognitiva”. Además, recientemente se ha observado que no sólo la educación en la infancia es importante, sino que también lo es la estimulación cognitiva constante a lo largo de la vida, en lo conocido como la hipótesis de la estimulación mental (“the use it or lose it hypothesis”). Según esta hipótesis, una estimulación mental continua puede conducir a alteraciones neuroquímicas y estructurales a nivel del cerebro que pueden incluso contrarrestar el efecto del bajo nivel educativo en la infancia. (159)

Las características epidemiológicas de sexo, edad y nivel educacional, fueron similares a las observadas en la población para estudio de autofagia, reparadores de DNA y proteína priónica que para la del gen *TP53*.

Por otro lado, hemos estudiado si los factores de riesgo vascular y los hábitos tóxicos se relacionan con el riesgo de demencia.

En nuestra muestra, se observó una alta prevalencia de HTA entre los pacientes con DV, aunque la prevalencia también fue moderadamente elevada en los controles (Tabla 19). Sin embargo en el grupo de sujetos con EA la prevalencia de HTA fue menor. Las diferencias observadas fueron significativas tanto para el grupo de DV como para EA.

Estos datos son similares a los observados en el registro ReDeGi, en el cual la HTA fue un factor de riesgo más importante para la DV que para la EA, estando presente en el 50,4% de los pacientes con EA y en el 76,8% de los pacientes con DV. En este registro, al igual que en nuestro trabajo, se excluyeron los casos de demencia mixta, lo cual puede explicar la menor prevalencia de hipertensos entre los sujetos con EA. (149).

En el análisis por subgrupos de DV también se observó una alta prevalencia de HTA para ambos grupos, siendo más elevada en el grupo de DV subcortical (Tabla 20), siendo esta diferencia estadísticamente significativa frente al grupo control. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios. (154)

En el análisis por subgrupos de EA la HTA fue más prevalente en el grupo de progresión normal, que el grupo de progresión rápida siendo ambas estadísticamente significativas frente al grupo control.

La HTA, es un factor de riesgo bien conocido de DV, sin embargo su implicación en el desarrollo de la EA no es tan clara. Recientes investigaciones epidemiológicas, patológicas y experimentales han demostrado la implicación de los factores de riesgo vascular en el desarrollo de EA. Así, determinados estudios han establecido que la HTA diagnosticada en la edad media de la vida constituye un factor de riesgo para el desarrollo posterior de EA. (160) Existe un concepto emergente por el cual la insuficiencia cerebrovascular crónica producida por la HTA, alteraría la barrera hematoencefálica, haciendo que ésta no pueda aclarar de forma correcta las diferentes sustancias tóxicas entre las que se encontraría la proteína A $\beta$ . (161,162).

Respecto a la relación entre DV y HTA, es bien conocido que la HTA mantenida produce alteraciones en la microvascularización que conllevan alteraciones de la sustancia blanca, microinfartos y microhemorragias relacionadas estrechamente con la disfunción cognitiva (161). Además, la HTA es el principal factor de riesgo del ictus. Este hecho podría explicar además la mayor prevalencia de HTA en pacientes con DV subcortical.

Varios estudios han sugerido que el tratamiento de la HTA con los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o los bloqueantes de los receptores de angiotensina II (ARA II) puede ser beneficioso para los pacientes con demencia. Por ejemplo, Yasar y cols. realizaron un estudio observacional donde determinaron que tanto el tratamiento con IECAs (OR = 0,5, IC 95% = 0,29-0,83) como con ARA II (OR= 0,31, IC95% = 0,14-0,68) reducía la incidencia de EA (162). Por otro lado, el estudio PROGRESS estableció que el tratamiento activo con perindopril (un IECA) se asociaba con un menor riesgo de demencia y de eventos cerebrovasculares recurrentes (RR= 34%, IC95% 3-55%) (163). Además, en un meta-análisis reciente, Zhuang y cols. concluyeron que tanto IECAs como ARAII eran beneficiosos para la prevención de la DV. (164). Por último, otro estudio reciente también demostró el beneficio del tratamiento tanto con IECAs (OR = 0,74; IC del 95% = 0,74-0,96;) como con ARAII (OR = 0,60, IC del 95% = 0,37-0,97) en DV, sin embargo no se tuvieron resultados estadísticamente significativos para EA. (165)

Respecto a la diabetes Mellitus (DM), en nuestro trabajo fue significativamente mayor en el grupo con DV, que en los controles, y sobre todo, en los pacientes con EA (Tabla 19). Estos valores, son similares a los observados en otros estudios. (148,158). La baja prevalencia de DM

entre los pacientes con EA puede explicarse, al igual que en el caso de la HTA, por la exclusión de los casos de demencia mixta. La alta prevalencia de DM en el grupo de DV podría explicarse porque la DM es un factor de riesgo independiente tanto para ictus isquémico como para su recurrencia, observándose un RR de 2,3 (IC95% 2,0-2,7) de ictus isquémico en pacientes diabéticos frente a no diabéticos. (166)

En el análisis por subgrupos de DV, se observó una mayor prevalencia de DM en DV cortical que en DV subcortical (Tabla 20), siendo esta diferencia estadísticamente significativa frente al grupo control. En otros estudios publicados hasta la fecha, no se encontraron diferencias significativas entre ambos subtipos. (154)

En el análisis por subgrupos de EA, no se observó que la DM fuera un factor significativo de rápida progresión. Dentro del grupo de progresión normal, la DM tuvo un comportamiento similar al del grupo global de EA siendo las diferencias respecto al grupo control estadísticamente significativas.

La relación entre la demencia y la DM es controvertida. Aunque inicialmente no se estableció una clara relación entre ser diabético y un mayor riesgo de demencia; posteriormente estudios prospectivos y retrospectivos poblacionales han podido demostrar que la prevalencia de la demencia aumenta en los pacientes con DM tipo 2. (167, 168, 169). Existen múltiples factores que contribuyen a que la prevalencia de demencia entre los pacientes diabéticos sea cada vez mayor. Así, como ya se ha comentado previamente, los pacientes diabéticos tienen mayor riesgo de enfermedad de pequeño vaso, ictus isquémico y su recurrencia. Esto es debido a que la hiperglucemia y la resistencia a la insulina favorecen la disfunción endotelial junto con alteraciones en la plasticidad sináptica, lo cual produce acumulación de productos finales de la glicación contribuyendo estos efectos al deterioro cognitivo. (168) Un estudio reciente ha observado una correlación fuerte entre la hiperglucemia postprandial y el riesgo de demencia. (170)

Por otro lado, la hiperglucemia interfiere con el metabolismo amiloide, lo cual favorece su acúmulo y toxicidad en el sistema nervioso central. (171) Además, se han observado mayores alteraciones en el metabolismo cerebral y puntuaciones más bajas en las escalas de detección de deterioro cognitivo en pacientes diabéticos portadores del alelo de APOE  $\epsilon$ 4. Ello proporciona un nuevo vínculo entre la diabetes y la demencia, que implicaría que pudiera haber factores genéticos que jugaran un papel fundamental en esta asociación. (171)

Una vez expuestos estos argumentos, es lógico pensar que una intervención en el control de la DM pudiera ser beneficiosa tanto para la prevención de la demencia como para su progresión. Sin embargo, múltiples estudios como el estudio ACCORD o el ACCORD-MIND, establecieron que, aunque un buen control de la diabetes produce menor atrofia cortical, ésta no tenía implicaciones en las funciones cognitivas. (172) Algunos estudios en animales han demostrado que el tratamiento con análogos de GLP-1 y/o agentes que reducen la resistencia a la insulina como las glitazonas pueden llegar a tener un efecto beneficioso sobre la cognición. Sin embargo, todavía no existen estudios que evidencien este efecto en humanos. (168)

La hipoglucemia producida por los tratamientos de la DM tiene un efecto deletéreo sobre las funciones cognitivas. Para evitar estas hipoglucemias, un estudio realizado en mujeres diabéticas mayores de 70 años determinó que en estos pacientes las sulfonilureas deben ser empleadas con precaución, mientras que las insulinas fueron más seguras. (173)

El antecedente de hipercolesterolemia fue más frecuente en el grupo de DV, en comparación con los controles, y los pacientes con EA (Tabla 19). Estas diferencias son superiores a las observadas en otros estudios. (140) La menor prevalencia de hipercolesterolemia entre los pacientes con EA podría ser secundaria a la menor ingesta calórica de estos pacientes sobre todo en fases avanzadas de la enfermedad. Por otro lado, la alta prevalencia entre los pacientes con DV podría ser debido a que la dislipemia constituye un factor de riesgo sobre todo para los ictus de origen aterotrombótico. Una cifra total de colesterol elevada con la tasa de lipoproteínas de baja densidad (LDL) alta y de lipoproteínas de alta densidad (HDL) baja constituye un factor comprobado de predisposición isquémica. (167)

En el análisis por subgrupos de DV, la hipercolesterolemia fue más frecuente en el grupo de DV subcortical que en el grupo de DV cortical siendo esta diferencia estadísticamente significativa frente al grupo control (Tabla 20). Estos resultados difieren con respecto a lo publicado en otros estudios, donde la hipercolesterolemia es más frecuente en la DV cortical. (154)

En cuanto al análisis por subgrupos de EA, se observaron porcentajes similares de hipercolesterolemia tanto en el grupo de rápida progresión (37,1%), como en los de progresión normal (36,4%).

La asociación entre la hipercolesterolemia y la EA es compleja y no está clara, ya que existen resultados contradictorios. Así, determinados estudios relacionan los niveles elevados de colesterol en suero con un mayor riesgo de desarrollar EA (174, 175, 176), mientras que otros estudios no han demostrado ningún efecto ni asociación negativa. (177) Estos hallazgos

contradictorios podrían atribuirse a diferentes diseños metodológicos, edades de los participantes o duración y seguimiento de los estudios. Se ha hipotetizado que la relación entre la hipercolesterolemia y la EA se debe a que ciertas proteínas que intervienen en el metabolismo lipídico se encuentran asociadas a EA -como la proteína APOE  $\epsilon$ 4, las proteínas ABCA-7, o las clusterinas-, favoreciendo su disregulación la cascada amiloidea. (178)

La relación con la DV tampoco está clara ya que, aunque es un factor de riesgo bien conocido de ictus (161), su influencia sobre el deterioro cognitivo varía de unos estudios a otros. Así, en un estudio basado en registros médicos, las concentraciones altas de colesterol en edades medias de la vida se relacionaron con mayor riesgo de DV (170). Por otro lado, una revisión sistemática de 18 estudios prospectivos no encontró asociación entre los niveles de colesterol y el riesgo de desarrollar DV. (179)

Se han llevado a cabo estudios que determinan si el tratamiento de la hipercolesterolemia pudiera ser beneficioso tanto para la prevención de la demencia como para su progresión con resultados diversos. Así, un estudio llevado a cabo por el Heart Study Collaborative Group estableció que el tratamiento con Simvastatina no presentaba ningún efecto sobre el estado cognitivo. (180) El estudio PROSPER evaluó el mismo objetivo, aunque con una estatina menos potente como la Pravastatina, sin encontrar tampoco ningún efecto beneficioso. (179) En resumen, la evidencia hasta la fecha sugiere que las estatinas administradas en etapas posteriores de la vida no tienen ningún efecto sobre la prevención del deterioro cognitivo o demencia.

En referencia a los hábitos tóxicos, analizamos el hábito tabáquico y el enolismo. En cuanto al tabaquismo, se tuvieron en cuenta tanto fumadores como ex fumadores de hace menos de 5 años. En cuanto al enolismo lo contabilizamos como un consumo de más de 40 g/día de alcohol.

Utilizando estos criterios, con respecto al hábito tabáquico se observó un predominio de fumadores en los pacientes con DV, respecto a los controles y los pacientes con EA (Tabla 21). En el estudio del hábito tabáquico por subgrupos de DV, se encontró una distribución similar en ambos subgrupos, DV cortical y DV subcortical (Tabla 22). Estos resultados son similares a los descritos en estudios previos. (154). En EA, no se objetivaron diferencias en función de la velocidad de progresión. El menor porcentaje de fumadores en el grupo de EA, podría explicarse por el predominio de mujeres en este grupo teniendo en cuenta los hábitos sociales de nuestro entorno.

El hábito tabáquico constituye un factor de riesgo para múltiples enfermedades crónicas. Sin embargo, su relación con la demencia es controvertida. Es bien conocido que el tabaco es un factor de riesgo para ictus o eventos cerebrovasculares (ECV) y, por lo tanto, es lógico pensar que el tabaco colabora en el desarrollo de DV. No obstante, varios estudios han demostrado que el tabaquismo por sí mismo es un factor de riesgo para el desarrollo de DV, independientemente de haber padecido o no un ictus. De modo similar se ha demostrado un impacto directo del tabaquismo en el desarrollo de EA. Esto podría explicarse por el efecto nocivo del tabaco sobre el estrés oxidativo y los mecanismos de inflamación que colaborarían en el proceso neurodegenerativo. (181)

Por otro lado, se ha descrito un posible efecto biológico beneficioso del tabaco sobre la EA, ya que la nicotina mejora la liberación de acetilcolina a través del aumento de receptores de nicotina, produciendo de forma secundaria una mejora en la atención y en el procesamiento de la información. (181)

En cuanto al enolismo, en nuestra muestra se observó un mayor consumo de alcohol entre los sujetos con DV, respecto a los controles y EA (Tabla 21). Respecto a los diferentes subgrupos de DV, se observó un consumo discretamente superior entre los pacientes con DV cortical respecto a los sujetos con DV subcortical. En cuanto a los subgrupos de EA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al analizar la velocidad de progresión de la EA. Al igual que sucede con el tabaquismo, el bajo porcentaje de consumo de alcohol en el grupo de EA podría explicarse por el predominio de mujeres en este grupo y los hábitos sociales de nuestro entorno.

La relación entre el enolismo y el desarrollo de demencia es controvertida. El alcohol consumido en cantidades moderadas podría ser beneficioso por diversos mecanismos. Por un lado, el alcohol en cantidades moderadas tiene la capacidad de reducir algunos factores de riesgo vascular, ya que posee un efecto amortiguador sobre la agregación plaquetaria además de la capacidad de modificación del perfil lipídico. Por otro lado, el etanol favorece la liberación de acetilcolina en el hipocampo, mejorando los procesos de aprendizaje y memoria. (182) De hecho, en el estudio Rotterdam se observó que un consumo leve-moderado de alcohol (definido como la ingesta de 1-3 veces al día) producía un menor riesgo tanto de EA (RR 0,58) como de DV (RR 0,29). (147). Consumos más elevados de alcohol parecen relacionarse con aumento del riesgo de demencia. Así en el *Cardiovascular Health Study*, los sujetos mayores de 65 años que consumía entre 1-6 bebidas por semana presentaban un RR 0,46 frente a los abstemios, mientras que con consumos mayores se perdía el efecto beneficioso e incluso con

más de 14 bebidas se aumentaba el RR a 1,22. (178) Este efecto también se observó en otro estudio donde con consumos mayores de 15 gr/día se perdía el efecto beneficioso. (183,184)

Las características en cuanto a los factores de riesgo y hábitos tóxicos, fueron similares tanto en la población para estudio de autofagia, reparadores de DNA y proteína priónica como en la del gen TP53.

En resumen, los resultados obtenidos en nuestro estudio, confirman que los factores de riesgo cardiovascular influyen de forma significativa en el desarrollo DV y los diferentes subtipos de DV. Los marcadores de riesgo para EA fueron la edad, y el sexo. Los factores de riesgo vascular tuvieron una influencia moderada sobre el desarrollo de EA. En definitiva se recomienda un buen control y tratamiento de los factores de riesgo, sobre todo de la HTA, como estrategia de prevención tanto para EA, como para DV.

### **2.2: ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA DEMENCIA**

En el presente estudio, el tiempo de evolución y seguimiento medio entre ambos grupos de demencia fue entorno a los 4 años. El tiempo medio entre los subgrupos de DV también fue cercano a 4 años. Estos resultados aportan homogeneidad al estudio así como mayor validez a los resultados obtenidos al realizar las diferentes comparaciones entre rendimiento cognitivo y el nivel funcional de las diferentes demencias.

Para evaluar la severidad de las demencias empleamos la escala *Clinical Dementia Rating* (CDR). Esta escala es el sistema de clasificación más ampliamente empleado para la valoración de la gravedad de las demencias. En nuestro estudio, la mayoría de los sujetos tenían un estadio leve-moderado, estos datos difieren respecto a los de otros registros como el ReDeGi donde la mayoría de los sujetos incluidos se encontraban en fase leve. (Tabla 22)(148).

En cuanto al análisis por subgrupos de DV, dentro del grupo de DV cortical se observó un predominio de estadios moderados mientras que en el subgrupo de DV subcortical el predominio se observó en estadios leve-moderado. (Tabla 23)

Para la valoración del rendimiento cognitivo empleamos el *Mini-mental State Examination* (MMSE). El test MMSE constituye una herramienta fácil de aplicar que nos permite de una manera rápida y sencilla tamizar las alteraciones cognitivas. Sin embargo, para algunos aspectos es deficitaria, ya que apenas evalúa las funciones ejecutivas, visuoespaciales y la memoria semántica. (127)

En nuestro estudio, la puntuación media de MMSE entre los pacientes con EA fue de 14,99 puntos frente a 16,40 puntos dentro del grupo de DV. Estos resultados difieren en lo observados en otros estudios, donde no se observaron diferencias significativas entre los diferentes subtipos de demencia. (148) Aunque las diferencias encontradas en la CDR de ambos grupos no fueron estadísticamente significativas, había más sujetos con grado grave dentro del grupo de EA que en el de DV lo cual puede explicar los puntajes inferiores en el MMSE de EA respecto a DV.

Entre los subgrupos de DV se observó que la puntuación media entre el grupo de DV cortical fue de 15,23 puntos frente a 17,54 puntos en el grupo de DV subcortical. Estos resultados son diferentes a lo publicado hasta la fecha ya que según el estudio de Staekenborg y cols. no se observaron diferencias significativas entre ambos subgrupos. (154). En la DV cortical el deterioro suele ser escalonado y más fluctuante, mientras que en la DV subcortical el deterioro es más progresivo y gradual, esto podría justificar la diferencia en las puntuaciones MMSE entre ambos subtipos.

Por último, también evaluamos la asociación entre el alelo APOE  $\epsilon 4$  y el riesgo de desarrollar EA y DV. La presencia de portadores de APOE  $\epsilon 4$  fue mayor en el grupo de EA y en el grupo de DV frente al grupo control (Tabla 28). Según el subtipo de DV se observaron porcentajes similares entre ambos subgrupos. Se encontró el mismo resultado al analizar los diferentes subgrupos de EA.

APOE es una lipoproteína que tiene 3 isoformas (APOE  $\epsilon 2$ , APOE  $\epsilon 3$  y APOE  $\epsilon 4$ ) que difieren en sustituciones de dos aminoácidos implicando reemplazos de cisteína-arginina en posiciones 112 y 158. APOE en el SNC está producida por una amplia variedad de células (entre ellas los astrocitos) y su función principal es el transporte de lípidos (colesterol fundamentalmente) a las neuronas para que éstas puedan llevar a cabo una correcta sinaptogénesis. El alelo APOE  $\epsilon 4$  es el principal factor genético de riesgo para la EA de inicio tardío. Se estima que entre el 35-40% de los pacientes con EA tienen al menos un alelo de APOE  $\epsilon 4$ . La APOE  $\epsilon 3$  se asocia con un riesgo intermedio, y la APOE  $\epsilon 2$  con el menor riesgo de padecer la enfermedad. (185)

El mecanismo a través del que APOE  $\epsilon 4$  confiere mayor riesgo de EA es a través de la escisión proteolítica de sus extremos N- y C-terminales, que produce toxicidad ya sea por ganancia o pérdida de función. (186)

La relación de APOE  $\epsilon 4$  con la DV está menos clara y en la literatura encontramos resultados no concluyentes. En una revisión de 24 estudios, se determinó en 14 de ellos que los portadores de APOE  $\epsilon 4$  presentaban mayor riesgo de DV, mientras que en otros 9 estudios no se observó

relación, sugiriendo que al estar estos estudios realizados en diferentes poblaciones, una de las causas que podrían explicar la variabilidad serían factores étnicos, geográficos o del entorno como puede ser la dieta. (187) En conclusión, a pesar de la heterogeneidad de los estudios, se cree que APOE  $\epsilon$ 4 puede actuar como factor de riesgo para DV aunque no con tanta potencia como en el caso de EA. (187,188)

### **3. ESTUDIO GENÉTICO**

#### **3.1 ASPECTOS GENERALES**

Actualmente existen dos mecanismos principales para el estudio y rastreo de los genes relacionados con determinadas enfermedades: los estudios del gen candidato y los que exploran todo el genoma conocidos como GWAS.

En la presente tesis hemos realizado un estudio de asociación entre casos y controles que se incluyen dentro del primer grupo. Estos estudios comparan la frecuencia de los alelos o genotipos de un polimorfismo en ambos grupos. Son estudios baratos, rápidos en su ejecución y tienen la potencia suficiente para detectar variables de poca penetrancia, por lo que se han considerado y se consideran los estudios más empleados para la caracterización de la aportación de uno o varios genes a una enfermedad. Son adecuados cuando se tiene una hipótesis biológica o cuando se ha identificado un gen candidato mediante estudios de ligamiento. Se consideran un método de estudio eficaz para establecer las variantes genéticas que subyacen a las patologías complejas o poligénicas. (189)

La crítica que se hace a este tipo de estudios es el hecho de que con frecuencia no son replicables y que las asociaciones observadas pueden ser inexactas. Una de las principales causas de estas discrepancias pueden ser los tamaños muestrales empleados, ya que la mayoría incluyen entre 100 y 500 sujetos y en ocasiones pueden no tener el poder estadístico suficiente. Este hándicap ha intentado solventarse a través de los metanálisis que incluyen todos los estudios publicados para un determinado SNP. De este modo, se aumentaría el tamaño muestral y, por lo tanto, la potencia estadística.

Otra de las críticas realizadas es que la discrepancia entre los diferentes resultados obtenidos pueda ser secundaria a que son estudios realizados en sujetos de diferentes etnias, sugiriendo que los polimorfismos que modifican el riesgo de un tipo de demencia en un grupo étnico podrían carecer de significado en otro.

Por último, en ocasiones los grupos de casos y controles empleados en estos estudios no son comparables ya que difieren en factores que podrían ser importantes para el desarrollo de la enfermedad (como edad, sexo...) lo que podría hacer que las diferencias observadas entre ambos grupos sean secundarias a estos factores y no a la enfermedad en sí misma.

Para intentar solventar estos problemas, en nuestro trabajo, hemos realizado un análisis de regresión logística, para controlar las variables de edad y género y así confirmar que los hallazgos observados tienen lugar con independencia de estas variables. Además para poder conocer si el grupo control era representativo de la distribución de sujetos sin demencia dentro de la población general, se realizó el estudio de equilibrio de poblaciones de Hardy-Weinberg que nos permitió comprobar la representatividad del grupo respecto de la población general sin demencia y que, por tanto, da validez a los resultados obtenidos.

### 3.2 GENES REPARADORES DE DNA

Las células poseen diversos mecanismos reparadores que evitan la acumulación de mutaciones y facilitan el mantenimiento de la integridad genómica. Las cuatro vías fundamentales para la reparación del daño en DNA son: la reparación por escisión de nucleótidos, la reparación por escisión de bases, la reparación de roturas de doble cadena y la reparación de emparejamientos erróneos. (30) En el presente trabajo se estudiaron tres polimorfismos relacionados con la reparación de DNA: Arg399Gln del gen *XRCC1*, Lys751Gln del gen *ERCC2* y Thr241Met del gen *XRCC3*.

Se ha postulado que estos polimorfismos podrían asociarse a un aumento del riesgo de desarrollar EA a través de la presencia de DNA fragmentado (que está formado por DNA no reparado) en los ovillos neurofibrilares típicos de la EA. En consecuencia, el depósito de DNA no reparado y la incapacidad para poder reparar estos daños podrían contribuir a la pérdida neuronal típica de la EA.

Se han publicado estudios que relacionan estos polimorfismos con mayor riesgo de ictus isquémico. (47,48,49)

#### 3.2.1 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Arg399Gln DEL GEN *XRCC1* (rs25487)

Se han descrito más de 60 polimorfismos relacionados con el gen *XRCC1*, de los cuales el más estudiado es el polimorfismo Arg399Gln, localizado en el exón 10, en el dominio BRCT-1. De

acuerdo con los diferentes estudios, la variante Gln está presente en el 23-36% de la población general, y se ha demostrado que la presencia del alelo Gln se asocia con una capacidad de reparación de DNA reducida. Se han realizado una gran cantidad de estudios epidemiológicos moleculares para evaluar el papel del polimorfismo Arg399Gln en el riesgo de cáncer; sin embargo, los resultados siguen siendo contradictorios en lugar de concluyentes. (45)

*XRCC1* tiene un papel fundamental en la reparación del DNA a través del mecanismo de escisión de bases (BER). La interacción de *XRCC1* y su sustrato facilita la unión del resto de factores de los complejos reparadores y regula la actividad de varias enzimas, como la poli-ADPribosa polimerasa 1 (PARP1), ligasa III o la DNA polimerasa  $\beta$ . El polimorfismo Arg399Gln se localiza junto a la región BRCT1, y la sustitución de Arginina por Glutamina condiciona un cambio en la conformación tridimensional de la proteína lo que produce una disminución de su capacidad reparadora. (36) Varios investigadores han demostrado que en el tejido cerebral de roedores viejos existe una baja actividad de la vía BER, principalmente atribuido a la disminución de la actividad de la proteína DNA polimerasa  $\beta$ , lo cual produce una disminución de la 8- hidroxidesoxiguanosina libre. En el LCR de pacientes con EA se han detectado niveles bajos de 8- hidroxidesoxiguanosina libre, lo cual indica niveles elevados de DNA no reparado en la EA. (33) Esta actividad disminuida de BER por la que se produce este proceso también ha sido reportada por Lovell y cols. (189)

Los datos que relacionan Arg399Gln con la EA son escasos y controvertidos. En 2008, Parildar-Karpuzoğlu y cols. determinaron que no existía asociación significativa entre EA y el polimorfismo Arg399Gln (OR=1.05, 95% CI=0.68-1.63). (185) Por otro lado, en 2015, Kwiatkowski y cols. llevaron a cabo un estudio en población caucásica donde se observó una asociación entre los portadores del genotipo Arg/Gln y el riesgo de desarrollar EA, mientras que ser portador del genotipo Gln/Gln reducía el riesgo de EA. (46)

En nuestro estudio no se encontraron diferencias en la frecuencia de distribución de los diferentes genotipos del polimorfismo Arg399Gln de *XRCC1* entre pacientes con EA y controles. Tampoco se encontraron diferencias significativas al análisis por edad ni según estado de APOE  $\epsilon$ 4.

Respecto a la DV, *XRCC1* tiene un papel importante en la eliminación de las especies de oxígeno reactivo (ROS). Los ROS son subproductos del metabolismo celular normal que, si no son eliminados correctamente, pueden acabar ocasionando un daño significativo en las diversas estructuras de DNA. Se ha sugerido que un mal funcionamiento de las vías de

reparación celular podría determinar un cúmulo de ROS; de este modo, su exposición crónica en concentraciones elevadas podría aumentar el riesgo de ictus isquémico. Además, la lesión por la isquemia y posterior reperfusión secundaria al ictus agudo también está mediada por ROS. (191)

Se han descrito asociaciones entre este polimorfismo y el riesgo de padecer ictus isquémico con resultados controvertidos. Un estudio llevado a cabo por Gürdal Orhan y cols. (47) en población turca demostró una asociación estadísticamente significativa y el riesgo de ictus, siendo éste el doble en pacientes con los genotipos Arg/Gln, Gln/Gln y Arg/Gln+Gln/Gln. Este riesgo aumentaba tras el ajuste por edad, sexo e índice de masa corporal.

Por otro lado, otro estudio llevado a cabo con 114 pacientes, no encontró una asociación significativa. (48)

Un estudio realizado en 2016 por Wei He y cols. observaron que los pacientes que tenían el genotipo Arg/Gln-Gln/Gln de Arg399Gln se asociaba significativamente con el riesgo reducido de ictus isquémico, un evento cerebrovascular inicial más leve y con una mejor recuperación a corto plazo (192). En otro estudio con 118 casos de accidente cerebrovascular, se observaron resultados similares (49).

En nuestro estudio no se encontraron diferencias en la frecuencia de distribución de los diferentes genotipos del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* entre pacientes con DV y controles. Tampoco se encontraron diferencias al análisis según el estado de APOE ε4.

Al realizar el estudio en función de la edad, observamos que tanto en el modelo codominante como en dominante ser portador del alelo Gln se asocia con un riesgo de más del doble de padecer DV (codominante  $p=0,004$  y  $0,037$  y dominante  $p=0,002$ ) (Anexo VII, Tabla 4)

En el análisis por subtipos de DV, no hemos encontrado evidencias de asociación específica del polimorfismo Arg399Gln con DV cortical o DV subcortical, ni tampoco al analizar los subgrupos en función del alelo APOE ε4.

Finalmente, realizamos un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en los pacientes con DV, y los subtipos de DV cortical y subcortical frente al grupo control no se observaron resultados estadísticamente significativos.

Por lo tanto, los estudios publicados hasta la fecha han encontrado resultados muy dispares y no permiten extraer conclusiones claras sobre el impacto del polimorfismo Arg399Gln del gen *XRCC1* y en el desarrollo de EA ni de DV. Los motivos para la discrepancia de estos resultados puede ser debida el tamaño muestral ya que la mayoría de los estudios comprenden menos de 500 pacientes lo que hace que carezcan del poder estadístico suficiente para detectar el modesto impacto que esta variante puede tener en el desarrollo de la EA y de DV. Otra causa, y sobre todo en el caso de DV, podría ser las diferencias étnicas, ya aquellos estudios que determinan el polimorfismo Arg399Gln como factor protector están llevadas a cabo en poblaciones asiáticas, donde presentan dietas ricas en grasas no saturadas y donde los factores de riesgo clásicos son menos prevalentes. Nuestro estudio no es capaz de detectar interacciones ni en EA ni en DV, excepto en el caso de los mayores de 80 años en DV. Se trataría por lo tanto, de variantes de muy baja penetrancia para incrementar el riesgo de demencia y, que por lo tanto; precisan de la conjunción de otros factores con los que interactúan o a los que, posiblemente, modulen.

### 3.2.2 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Lys751Gln DEL GEN *ERCC2* (rs13181)

Existen múltiples polimorfismos relacionados con el gen *ERCC2*, la mayoría de ellos en regiones intrónicas no codificantes. De los que se localizan en regiones exónicas, Lys751Gln es probablemente el más estudiado, estando la variante polimórfica Gln presente en el 30-40% de la población general. (51)

El polimorfismo Lys751Gln ha sido ampliamente estudiado en su relación con diversos tipos de tumores, encontrándose relación entre el polimorfismo Lys751Gln y el melanoma, cáncer epidermoide de cabeza y cuello, el de mama, el cáncer de vejiga y el glioblastoma multiforme. (54,55) Sin embargo, la relación con la EA no ha sido tan ampliamente estudiada. Un análisis por Western Blot de tejido cerebral post mortem (lóbulo frontal, cerebelo, lóbulo parietal, lóbulo temporal, lóbulo occipital) de 10 pacientes con EA relativamente jóvenes ( $58,7 \pm 5,7$  años) revelaron cantidades significativamente mayores de proteínas NER *ERCC2* (XPD) y *ERCC3* (XPB) en todas las regiones cerebrales analizadas que en los pacientes controles. (193) Existen muy pocos estudios que relacionen el polimorfismo Lys751Gln con EA, ya que la implicación de los mecanismos NER no está tan clara como la de los BER. Recientemente S. Dogru-Abbasoglu y cols. han estudiado en la población turca la relación del polimorfismo Lys751Gln

del gen *ERCC2* con el riesgo de padecer EA sin encontrar resultados estadísticamente significativos (56).

En nuestro estudio no se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos de Lys751Gln del gen *ERCC2* entre pacientes con EA y controles. (Tabla 33) El análisis de los genotipos en función de la edad así como en función del estado de APOE  $\epsilon 4$  no mostró resultados estadísticamente significativos.

Por otro lado, los mecanismos NER también se encuentran relacionados con la eliminación de productos ROS y, como ya se comentó en el apartado anterior, su exposición crónica en concentraciones elevadas podría aumentar el riesgo de ictus isquémico. (47). Se han descrito asociaciones entre este polimorfismo y el riesgo de padecer ictus isquémico.

Así, Mahabir y cols. en 2007 observaron que el codón 312 de XPD23 se asociaba con un riesgo significativamente mayor de ictus (RR 2.18, 95% CI 1.14-4.17,  $p = 0.010$ ). (49) A su vez, un estudio llevado a cabo por Shyu y cols. en población asiática demostró una asociación estadísticamente significativa entre ser portador del alelo Gln751 y el riesgo de ictus de gran vaso de origen aterosclerótico (OR: 1.69, 95%CI: 1.02-2.86). Además, el riesgo se incrementaba 2,73 veces en los pacientes fumadores ( $p=0,027$ ) (48).

Este es el primer trabajo que evalúa el polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2* en relación con DV. En nuestro estudio, no se encontraron diferencias entre la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2* entre pacientes con DV y controles. (Tabla 49) El análisis de los genotipos en función de la edad así como según el estado de APOE  $\epsilon 4$ , tampoco arrojó diferencias significativas. (Tabla 50 y Anexo VII tabla 5)

En el análisis por subtipos de DV, no hemos encontrado diferencias significativas entre ambos subtipos, ni tampoco en función del estado de APOE  $\epsilon 4$ . (Tablas 51, 52 y 53)

El análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en la comparativa entre los pacientes con DV, y los subtipos de DV cortical y subcortical y el grupo control. No mostró diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres grupos.

Los estudios sobre el polimorfismo Lys751Gln son escasos y están realizados en tamaños muestrales pequeños. Los resultados de nuestro estudio pueden explicarse, o bien porque no exista relación entre el polimorfismo Lys751Gln y la EA y DV, o bien porque nuestro tamaño muestral era pequeño y no permitía detectar las diferencias.

### 3.2.3 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Thr241Met DEL GEN *XRCC3* (rs861539)

El polimorfismo Thr241Met de *XRCC3* es probablemente el polimorfismo más ampliamente estudiado dada su alta frecuencia en la población general, ya que se ha descrito la presencia del alelo T (Met241) con una frecuencia entre el 22 al 44% de la población. (58)

Dentro de los mecanismos de reparación del DNA juega un papel clave en la reparación de Roturas de Doble Cadena de ADN (DSBR) a través del mecanismo de Recombinación Homóloga (58).

Es bien conocida su relación con diversos tipos tumorales así como a la respuesta de diversos fármacos quimioterápicos. Sin embargo, su relación con la EA es limitada. Un estudio investigó el rol de la proteína DNA kinasa (DNA-PK) en la EA a través de un estudio Western Blot que empleó anticuerpos contra subunidades específicas de la DNA-PK. En este estudio, que se llevó a cabo en 39 pacientes con EA y 7 controles, no se encontraron cantidades diferentes de estas sustancias entre ambos grupos. (194) Sin embargo, en una extensión del estudio donde se añadieron 7 casos de EA y 6 controles más observaron menores niveles de las subunidades de DNA-PK en pacientes con EA. Los niveles de estas subunidades se relacionan con la actividad de la proteína, por lo que estos resultados sugerían que en pacientes con EA los mecanismos de reparación por DBS están disminuidos. (194) Estos hallazgos se confirmaron en otro estudio de Western Blot, donde también se observó una disminución de derivados proteicos de los mecanismos de DBS en la corteza cerebral de pacientes con EA. Por último, un inmunoanálisis en secciones de cerebelo de pacientes con EA y en controles determinó que la disminución de las proteínas que intervienen en los mecanismos de DBS sólo ocurría en la corteza, región que, como ya se ha comentado, primariamente se ve afectada en la EA. (193)

A pesar de conocerse la influencia de las vías de genes reparadores de DNA en el desarrollo de EA, todavía no se han llevado a cabo estudios que relacionen el polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* y la EA. Nuestro estudio es el primer trabajo que intenta determinar la relación entre el polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* y la EA. No encontramos diferencias en la frecuencia de los diferentes genotipos de Thr241Met entre pacientes con EA y controles. Tampoco encontró diferencias en según los diferentes grupos de edad ni según el estado de APOE ε4. (Tabla 35, 36 y Anexo VII tabla 3)

Estos resultados, sugieren aunque los mecanismos de reparación del DNA están involucrados en la patología de la EA, no lo estén probablemente en las manifestaciones clínicas de la misma. Aun así, los resultados obtenidos pueden explicarse por el pequeño tamaño muestral, por lo que sería necesario replicarlos en estudios con mayor número de pacientes para poder detectar posibles asociaciones.

Un estudio de 2015 realizado por Grazia y cols. se evaluó la asociación entre la exposición a la radiación a largo plazo en un laboratorio de cateterismos cardíacos y signos tempranos de aterosclerosis subclínica asociados a la presencia del polimorfismo Thr241Met. Según este estudio, la presencia del alelo Met se relacionaba con un aumento del grosor de la íntima-media carotídea, confirmando la hipótesis de la implicación de la alteración en los mecanismos de reparación del DNA en el envejecimiento vascular acelerado y la aterosclerosis. (195).

Otra investigación, realizada en población turca, determinó la relación entre el polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* y la enfermedad coronaria, estableciendo que el genotipo Thr/Thr así como el alelo Thr del gen *XRCC3* incrementaban significativamente el riesgo tanto de síndrome coronario agudo como de enfermedad coronaria crónica frente al grupo control ( $p < 0,05$ ). (196)

Por último, otro estudio de 2017 estableció la relación del alelo Met del gen *XRCC3* con la hipertrofia ventricular secundaria a la HTA, postulando como posible mecanismo el depósito de DNA no reparado que alteraría el ciclo celular, induciendo la senescencia celular y el fenotipo proinflamatorio. (197)

En nuestro estudio, tanto los individuos Met/Met en el modelo codominante como los portadores del alelo Met en el dominante presentan un aumento del riesgo de tener DV (6,43 veces mayor en el caso del codominante y 2,22 veces menor en el dominante), y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,0001$ ;  $p=0,0001$ ). El modelo recesivo muestra que los individuos portadores del alelo Thr (Thr/Thr + Thr/Met) tienen un riesgo disminuido de tener DV, (0,19 veces menos) frente a los homocigotos para Met (Met/Met), alcanzando la significación estadística ( $p=0,0001$ ). (Tabla 55).

En el análisis por grupos de edad, estos resultados se mantienen, tanto en el grupo de mayores de 80 años como en el de menores de 80 años. (Anexo VII, tabla 6)

Estos hallazgos nos permiten concluir que los portadores del alelo Met tienen aumentado el riesgo de padecer DV, y que ello sucede independientemente de la edad y del género.

En el análisis según el estado de APOE  $\epsilon 4$  también se mantenían los mismos resultados tanto en el grupo de portadores como en el de no portadores. Es decir, que el riesgo aumentado de DV que tienen los pacientes portadores del alelo Met no se modifica por el hecho de ser portador o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ .

El análisis por subtipos de DV muestra un comportamiento en ambos subgrupos similar al de la DV global. (Tabla 57) En el análisis según el estado de APOE  $\epsilon 4$ , el comportamiento en el grupo de DV subcortical fue similar al de la DV global. En cuanto al grupo de DV cortical el comportamiento fue similar, aunque entre los portadores de APOE  $\epsilon 4$  no se llegaba a la significación estadística. Dado que el comportamiento observado en DV cortical y subcortical es similar y además apoya a lo objetivado en el grupo de DV global, los resultados no significativos entre los portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  en DV cortical podrían ser debidos a que el tamaño muestral no es el suficiente para alcanzar la potencia estadística.

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y hábito enólico en la comparativa entre los pacientes con DV, y los subtipos cortical y subcortical frente al grupo control, donde se confirmaron los resultados anteriores. (Tabla 60)

Este es el primer estudio que determina la relación del polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* y la DV. Los resultados establecen una clara relación entre ser portador del alelo Met, que se relaciona con una menor capacidad de reparación del DNA, y el desarrollo de la enfermedad. Estos resultados deben interpretarse con cautela, y deberían reproducirse en grupos de estudio mayores para poder determinar una clara asociación. Estos hallazgos, refuerzan el interés del estudio de esta vía tanto para el diagnóstico de la enfermedad como para el desarrollo de nuevos fármacos.

### **3.4 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Met129Val DEL GEN *PrNP* (rs1799990)**

El gen que codifica la proteína priónica humana (*PrNP*) se localiza en la región cromosómica 20p12.3 y codifica una proteína de 253 aminoácidos altamente conservados en los mamíferos. (99)

Se han descrito varios polimorfismos en relación con este gen, pero ,entre todos, el más prevalente es el Met129Val que produce un cambio de Metionina (M) por Valina (V) en el codón 129, lo que da lugar a tres posibles fenotipos; Met/Met, Val/Val, Met/Val.

La relación entre el polimorfismo Met129Val y EA se ha estudiado ampliamente en diversas poblaciones con resultados muy heterogéneos.

Así, en las series europeas (holandesa, alemana y polaca), los polimorfismos del codón Met129 se asociaban con aumento del riesgo de desarrollar EA. La serie holandesa determinó que la EA de inicio precoz era más frecuente en sujetos con historia familiar de EA y portadores de genotipo Val/Val. En las series alemanas y polacas, sin embargo, fue el genotipo Met/Met el que demostró conferir más riesgo de desarrollo de EA. (119, 120, 121)

Por otro lado, en un estudio realizado en población italiana, a pesar de que no se encontraron diferencias entre la frecuencia de los polimorfismos del codón 129 en pacientes con EA, la presencia del alelo Val se relacionó con inicio más precoz y enfermedad más agresiva. (198)

En la línea de estos resultados se encuentra un meta-análisis reciente sobre pacientes caucásicos, donde se concluyó que los homocigotos (tanto metionina como valina) tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar EA, independientemente de la edad de inicio de la enfermedad. (125)

Sin embargo, otras series (italiana, americana y española) no encontraron ningún tipo de asociación. (122, 123) Esta misma conclusión se obtuvo en un estudio japonés, donde se analizó la relación con el inicio precoz o tardío de la enfermedad, sin encontrarse ninguna asociación. (124)

Nuestro estudio no encontró diferencias en la frecuencia de los diferentes genotipos de Met129Val entre pacientes con EA y controles. (Tabla 61). Tampoco se encontraron diferencias significativas al análisis por grupos de edad (Anexo VII, Tabla 7)

Por último, también se analizaron los modelos según si eran o no portadores de alelo APOE  $\epsilon 4$ . Entre aquellos individuos no portadores de APOE  $\epsilon 4$  se demostró una asociación directa entre EA y el genotipo Met/Val ( $p = 0,011$  en el modelo codominante y  $p=0,025$  en el dominante.) En cambio, entre los portadores del alelo  $\epsilon 4$  no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos. (Tabla 63)

Estos resultados difieren de lo publicado en otras series. Así, en 2000 Combarro y cols. no encontraron ninguna interacción entre APOE  $\epsilon 4$  y el polimorfismo Met129Val en pacientes con EA. (199). Tampoco encontraron asociación entre portadores y no portadores de APOE  $\epsilon 4$  Smid y cols. en el 2013. (200) o los coreanos Ahn y cols. en el 2006 (201)

En un trabajo de 2011 llevado a cabo por Calero y cols. , se estudió la influencia del polimorfismo Met129Val en el desarrollo de EA en función del estado de portador o no de APOE  $\epsilon 4$ . En este trabajo se determinó que el genotipo Met/Met constituía un factor de riesgo para el desarrollo de EA en pacientes portadores de APOE  $\epsilon 4$ . Para poder estudiar mejor la interacción de estos dos factores se analizó el riesgo de desarrollar EA para sujetos con ambos rasgos (portadores de APOE  $\epsilon 4$  y homocigotos de *PrNP* Met129Met) en comparación con sujetos sin estos rasgos. Los sujetos homocigotos Met129Met que portaban al menos un alelo APOE  $\epsilon 4$  tuvieron un riesgo 7,68 veces mayor de desarrollar EA en comparación con los sujetos Val129Val sin alelos APOE  $\epsilon 4$  ( $p=0,0001$ ). (202)

En este estudio, los autores proponen un mecanismo de interacción entre *PrNP* y APOE  $\epsilon 4$  que favorecería la fisiopatología de la EA. Por un lado -como se ha comentado - la proteína *PrNP* regula los péptidos A $\beta$  haciendo que disminuya la división de APP a través de BACE1. Por otro lado, la proteína PrP celular también se ha identificado como un receptor de alta afinidad para oligómeros de A $\beta$ , la especie patológica responsable de la EA, mediando sus efectos nocivos. Con el fin de conciliar los diversos roles de la PrP celular en el metabolismo del A $\beta$ , se ha propuesto un ciclo de retroalimentación por el cual, en el cerebro normal, los niveles de péptidos A $\beta$  regulan la expresión celular de PrP que a su vez ejerce un efecto inhibitor sobre BACE1, disminuyendo los niveles de A $\beta$ . En la EA, este ciclo de retroalimentación se ve interrumpido por cada vez mayores cantidades de oligómeros A $\beta$  que se van uniendo a PrP celular cambiando su interacción con BACE1 y, por lo tanto, evitando su regulación. (202)

Respecto a la APOE  $\epsilon 4$ , se sabe que,-entre otras funciones- se encarga de estabilizar los oligómeros de A $\beta$ , haciendo que sea más difícil su eliminación.

De acuerdo con este modelo, se sugiere que la unión preferencial de APOE  $\epsilon 4$  a los oligómeros de A $\beta$  favorecería su acumulación y, por lo tanto, que se interrumpa el mecanismo de retroalimentación. (202)

La discrepancia entre los diversos estudios, incluido el nuestro, podría deberse tanto a diferencias étnicas como a otros factores no incluidos en nuestro estudio. Así, en España, mientras que el estudio de Combarro y cols. (que no determinaba asociación) reclutó sujetos del norte de España, el estudio llevado a cabo por Calero y cols. (en el que si había asociación entre genotipo Met/Met y ser portador de APOE  $\epsilon 4$ ) reclutó pacientes del centro y del este de España.

En nuestro estudio (donde ser portador de genotipo Met/Val entre los no portadores de APOE  $\epsilon 4$  se relacionaba con mayor riesgo de enfermedad), los pacientes reclutados eran en su mayoría del oeste de España.

Esto nos hace pensar que esta discrepancia puede ser explicada por la diferente distribución geográfica, que en los estudios poblacionales pueden jugar un importante papel en la interpretación de resultados. Por otro lado estos resultados deben interpretarse con cautela, ya que la muestra de pacientes con genotipo Met/Val y los no portadores de APOE  $\epsilon 4$  es pequeña (65 pacientes), y sería necesario realizar estudios en un número mayor de pacientes para validar los resultados. .

### 3.5 GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA

La autofagia es un mecanismo de degradación lisosomal por el cual se eliminan macromoléculas y orgánulos.

En la célula eucariota existen tres mecanismos de autofagia principales que son: autofagia mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia. En este trabajo nos centraremos sobre todo en la ruta de la macroautofagia, la cual a partir de ahora pasaremos a llamar autofagia. (70)

En relación con la autofagia se estudiaron los siguientes polimorfismos: Gln1383Glu del gen *ATG2B* (rs3759601), Thr300Ala del gen *ATG16L1* (rs2241880), Thr212Met del gen *ATG10* (rs1864483) y polimorfismo intrónico del gen *ATG5* (rs2245214).

Se ha postulado que la alteración de los procesos de degradación como la autofagia produce un depósito anómalo de sustancias en las neuronas, lo cual se ha relacionado con múltiples enfermedades neurodegenerativas como la EA, la Enfermedad de Parkinson o la Enfermedad de Huntington. (82)

La autofagia puede encontrarse alterada en múltiples puntos de la vía. Así, cuando se alteran los procesos iniciales, la proteína involucrada suele ser Beclina-1; cuando el defecto se produce durante el transporte de las vesículas, el defecto suele encontrarse en las proteínas PICALM; y cuando se alteran las fases finales, la proteína involucrada es la PSEN-1.

De este modo, se ha observado que en ratones transgénicos que expresan la proteína APP humana, la reducción de la expresión de Beclina-1 se relaciona con aumento de la acumulación intraneuronal de fragmentos  $A\beta$ , con mayores depósitos extracelulares de  $A\beta$ , así como con neurodegeneración. También se relaciona con cambios microgliales y anomalías en estructuras

neuronales profundas. Además, la administración de Beclina-1 a través de un vector lentiviral en los ratones transgénicos que expresaban APP redujo la cantidad de amiloide intracelular y extracelular. (85)

Por otro lado, la vía de la autofagia ha demostrado ser una de las principales vías de degradación de la proteína tau, por lo que su disregulación favorece el depósito de la misma. Alteraciones en las proteínas que favorecen el tráfico de los lisosomas por las células hacen que las vesículas de degradación se acumulen y, por lo tanto, se depositen sustancias tóxicas como la proteína tau. Esto se produce cuando se encuentran alteradas las proteínas PICALM encargadas del transporte vacuolar en la célula. (84,203)

Por último, se hipotetizó que uno de los posibles puntos donde podría verse afectada la autofagia era en los estadios finales, cuando se produce la degradación del autofagolisosoma. Se observó que las vacuolas fagolisosómicas de ratones transgénicos contenían cantidades anormales de LC3-II, proteínas ubiquitinadas y oligómeros A $\beta$ , sugiriendo que existía un mecanismo subyacente que producía una proteólisis defectuosa. Estos hallazgos se vieron reforzados cuando se determinó que PSEN-1 podría estar involucrado en la proteólisis defectuosa de la autofagia en pacientes con EA. Se ha observado que los fibroblastos de pacientes con EA familiar por mutación de PSEN-1 tienen una acumulación anómala de vacuolas fagolisosómicas, además de presentar una alteración en el recambio de las proteínas de vida larga. Las mutaciones del gen PSEN-1 ligadas a EA familiares tienen un efecto de pérdida de función sobre la proteólisis lisosómica, lo que lleva a la acumulación de vacuolas autofagosómicas y a la alteración en la degradación de las mismas. (203)

En relación a *ATG16L1*; éste gen codifica una proteína que forma parte de un complejo proteico relacionado con ATG5 y ATG7. El reclutamiento ineficaz de dichas proteínas como resultado de la variación de *ATG16L1* se traduce en un deterioro generalizado de las funciones de autofagia.

La proteína ATG5 forma parte del complejo ATG12-ATG5-ATG16L necesario para la formación del autofagosoma. El polimorfismo intrónico del gen *ATG5* se sitúa dentro del cromosoma 6 y produce un cambio de citosina (C) por guanina (G). En fibroblastos con PSEN-1 mutada se ha observado un aumento de la expresión de ATG5, entre otras proteínas, lo cual se ha relacionado con un deterioro crónico de las funciones de autofagia. (204) Además, estudios en ratones transgénicos con especificidad de células neuronales con delección de *ATG5* (*Atg5flox*

/ flox; nestin-Cre) mostraron retraso en el crecimiento y desarrollo de deficiencias motoras y conductuales progresivas. (95)

El gen *ATG10* es una enzima que interacciona con *ATG7*, permitiendo la conjugación de *ATG5* con *ATG12* para formar finalmente el complejo *ATG12-ATG5-ATG16L*. Se ha observado que en ratones “knockout” de *ATG7*, ante la ausencia de éste se impide su interacción con *ATG10* favoreciéndose la producción de agregados ubiquitinados que facilitan la neurodegeneración. (205)

En relación al gen *ATG2B*, en los humanos existen dos variantes homólogas de *ATG2*: *ATG2A* y *ATG2B*, similares entre sí. Ambas resultan esenciales en la formación del autofagosoma, así como en la regulación del tamaño y distribución de los remanentes lipídicos. Las proteínas de la familia *ATG2* son imprescindibles para la formación del autofagosoma, por lo que su disfunción produciría autofagosomas aberrantes que no se pueden digerir y daría lugar al depósito de sustancias tóxicas con el  $\beta$ -amiloide en el citosol de las neuronas.

Nuestro estudio ha sido el primero en estudiar la relación entre el polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1*, el polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B*, el polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10* y el polimorfismo intrónico del gen *ATG5* y la EA, sin encontrarse diferencias en la frecuencia de los diferentes genotipos entre pacientes con EA y controles. (Tabla 65, 67, 69, 71) Tampoco se encontraron diferencias significativas al analizar los diferentes grupos de edad, así como el estado de APOE  $\epsilon$ 4. (Tabla 66, 68, 70, 72 Anexo VII Tabla 8, 9, 10 y 11)

La negatividad de nuestros resultados puede ser debida, a que o bien, no existe asociación entre estos polimorfismos y el desarrollo de EA o que el tamaño muestral no es suficiente para detectar diferencias significativas. Se trataría por lo tanto, de variantes de muy baja penetrancia que precisan de la conjunción de otros factores con los que interactúan o a los que, posiblemente, modulen.

En relación con la DV, hay estudios que relacionan la vía de la autofagia con la isquemia cerebral. No obstante, existe controversia sobre si la activación de la autofagia es una manifestación de un mecanismo neuroprotector o, por el contrario, contribuye a una mayor muerte celular. (94)

Nitatori y cols. fueron de los primeros autores en relacionar la isquemia cerebral con la autofagia, ya que demostraron un aumento de lisosomas inmunopositivos para catepsina-B tras la isquemia cerebral transitoria. (206) Estudios posteriores respaldaron estos primeros

hallazgos, determinando un aumento de los niveles de LC3-II tras la isquemia hipóxica. Se han observado cambios similares en modelos de isquemia cerebral focal; así, Detegrev y cols. demostraron aumentos de LC3-II tras una oclusión transitoria de la arteria cerebral media (ACM) de los ratones. (207) Por otro lado, Rami y cols. objetivaron, además, que durante el periodo de penumbra tras una oclusión transitoria de ACM se incrementaban los niveles de Beclina-1. (208) Estos hallazgos sugieren que, tras la isquemia, se potencia el mecanismo de autofagia; sin embargo, el papel funcional que produce este incremento de la autofagia no está claro.

De este modo, es posible que su función venga influida por varios factores como son la madurez del tejido cerebral, la gravedad de la isquemia, así como el momento en que se lleven a cabo las intervenciones terapéuticas. Por ejemplo, la autofagia es mucho más pronunciada en cerebros maduros que en los inmaduros. Por otro lado, la autofagia tras la isquemia cerebral es región-específica: mientras que en el “core” de la lesión isquémica predomina la necrosis; la autofagia y la apoptosis es más prevalente en el tejido circundante al “core”. Por último, en función de la gravedad del evento isquémico se activan en mayor o menor medida estas vías: ante daños de gravedad media, la inducción de la autofagia es moderada y puede acabar desencadenando apoptosis a través de vías dependientes de caspasas; mientras que si la gravedad es mayor, la sobreactivación limitada de esta vía podría retrasar la progresión de las células hacia la muerte.

En conclusión, el papel de la autofagia en la isquemia cerebral es complejo, jugando diferentes roles durante las diferentes etapas de la isquemia cerebral; en este sentido, la mayoría de estudios apunta a un papel protector durante la isquemia, mientras que tendría un papel perjudicial durante la reperusión cerebral.

Respecto a la DV, nuestro estudio también ha sido el primero en evaluar la relación del polimorfismo Thr300Ala del gen *ATG16L1*, el polimorfismo Gln1383Glu del gen *ATG2B*, el polimorfismo Thr212Met del gen *ATG10* y el polimorfismo intrónico del gen *ATG5*, y DV, sin encontrarse diferencias en la frecuencia de los diferentes genotipos entre pacientes con DV y controles. (Tabla 82, 89, 95 y 101) Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al análisis por edad y según si eran o no portadores de APOE ε4. (Tabla 83, 90, 96 y 102, Anexo VII tablas 12, 13, 14 y 15).

Sólo al análisis del polimorfismo de *ATG2B* se observó entre los pacientes mayores de 80 años portadores del genotipo Glu/Glu en el modelo codominante un riesgo 2,83 veces mayor de desarrollar DV, alcanzándose la significación estadística ( $p=0,029$ ). (Anexo VII tabla 15)

En cuanto al análisis por subtipo de DV, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al analizar los diferentes modelos de herencia. (Tabla 84, 91, 97 y 103) También se llevó a cabo un análisis en cada uno de los subtipos según si eran o no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , sin obtenerse resultados significativos. (Tabla 85,86, 92,93, 98,99, 104 y 105 )

Se realizó un análisis de regresión logística ajustado por edad, género, educación, HTA, DM, hipercolesterolemia, hábito tabáquico y enólico en la comparativa entre los pacientes con DV, y los subtipos de DV cortical y subcortical y el grupo control, sin encontrarse resultados estadísticamente significativos. (Tabla 88, 94, 100 y 106)

Como se ha comentado anteriormente, el papel de la autofagia en la isquemia cerebral es complejo. La autofagia parece tener un efecto protector o incentivador del daño producido por la isquemia dependiendo del momento de la isquemia cerebral y del grado de sobreactivación de la vía. Nuestro estudio es el primero que determina la influencia de los polimorfismos de los genes *ATG16LI*, *ATG5*, *ATG2B* y *ATG10* en relación con la DV. La negatividad de nuestros resultados puede ser debida a que la implicación de los genes de la autofagia en la demencia vascular es compleja y probablemente secundaria a mecanismos más complejos que requerirían estudios *in vivo* para una mejor caracterización de los mismos. Por otro lado, una vez más, puede que el tamaño muestral no haya sido suficiente para la detección de las diferencias.

### **3.6 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DEL GEN DE LA PROTEÍNA SUPRESORA TUMORAL P53**

La proteína p53 es un factor de transcripción que regula múltiples e importantes procesos celulares, entre los que se encuentra la apoptosis.

Este polimorfismo se localiza en el exón 4, y produce un cambio de Arginina (Arg) por Prolina (Pro), siendo Arg el alelo pro-apoptótico y Pro el anti-apoptotico.

En cuanto a la relación de la proteína p53 con la EA, se ha observado que el incremento de estrés celular produce un aumento de la proteína precursora de amiloide (APP), la cual media en parte la expresión de *TP53* -ya que favorece la unión entre los complejos A $\beta$  y el promotor

de *TP53*-, aumentando la transcripción de la misma. Esto produciría una sobre-activación de *TP53* que induciría una muerte celular masiva, produciendo un mayor envejecimiento celular y, por lo tanto, predisponiendo a la EA (69). Por otro lado, *TP53* favorece la fosforilación de la proteína Tau.

La proteína TP53 también está relacionada con la apoptosis neuronal tras la isquemia cerebral. Hasta ahora, se conocía que en la zona periférica del infarto (zona de “penumbra”) era el sitio donde se producían los procesos apoptóticos y, por lo tanto, donde tenía lugar una sobre-activación de Tp53, correlacionándose este incremento con una mayor vulnerabilidad al daño isquémico. (209) Sin embargo, en 2014 Mei Li y cols. observaron que una regulación al alza del mecanismo TIGAR (regulador de la apoptosis y la glucólisis inducida por *TP53*) producía un aumento de NADPH y una disminución de productos ROS mitocondriales y, de este modo, se favorecería la conservación del potencial de membrana mitocondrial, se reduciría la activación de caspasa-3 y aumentaría la supervivencia neuronal. Además, los efectos neuroprotectores de la regulación al alza de TIGAR se imitaron mediante la suplementación con NADPH exógeno. Por lo tanto, TIGAR protege las neuronas contra la lesión inducida por isquemia / reperfusión, al menos parcialmente, al aumentar el suministro de NADPH y preservar la función de la mitocondria. (210) Otro estudio realizado en 2018 demostró que la sobre-expresión de TIGAR no solo redujo significativamente el volumen de infarto después de una lesión cerebral, sino que también redujo notablemente la mortalidad a largo plazo y mejoró la recuperación de las funciones neurológicas. (211)

Los datos de la relación del polimorfismo Arg72Pro con la EA son escasos, y los resultados obtenidos son contradictorios. En 2001, Emahazion y cols. estudiaron el polimorfismo Arg72pro en 121 pacientes con EA de inicio presenil y 152 controles, sin encontrar una asociación estadísticamente significativa. (212) Tampoco encontraron resultados estadísticamente significativos en 2003 Rosemann y cols. en otro estudio donde se compararon 109 pacientes con EA de inicio tardío y 111 controles. (213) Un único estudio realizado por Scacchi y cols. demostró relación entre el genotipo Pro/Pro y la EA esporádica (OR=2.02, IC95%:1.02-4.00, p=0.047). Estos mismos autores valoraron la influencia de ser portador o no del alelo APOE ε4, determinando que los sujetos sin el alelo APOE ε4 portadores del alelo Pro mostraban un incremento del riesgo de EA de inicio tardío al límite de la significación (p=0.07). (68) Estos hallazgos no concuerdan con el hecho de que la variante Arg72 induce una mayor apoptosis que la variante Pro72, por lo que quizás se precisen más estudios para determinar claramente la relación de la proteína Tp53 con la patogenia de la EA.

Un estudio anterior al presente trabajo, realizado en 150 pacientes con EA, mostró que ser portador de la variante Pro72 disminuía el riesgo de padecer EA. Esta hipótesis tiene base biológica y tendría sentido al tratarse el alelo Pro72 de la variante anti-apoptótica. Dado que los estudios previos no encontraban asociación, o si la encontraban ésta era al límite de la significación y con la variante Pro72 anti-apoptótica como indicador de mayor riesgo, decidimos replicar el estudio con un mayor número de pacientes.

En nuestro trabajo se apreció que tanto los individuos homocigotos para el alelo Pro en el modelo codominante como los portadores de al menos un alelo Pro (homo y heterocigotos) en el modelo dominante presentan una disminución del riesgo de tener EA, 0,62 veces menor en el caso del codominante y 0,56 veces menor en el dominante, y en los dos casos se alcanza la significación estadística ( $p=0,037$ ;  $p=0,008$ ). El modelo recesivo se muestra que los individuos portadores del alelo Arg72 tienen un riesgo aumentado de tener EA, prácticamente el triple (2,96), frente a los homocigotos para Pro72 (Pro/Pro), alcanzando la significación estadística ( $p=0,027$ ). (Tabla 107) Estos resultados se replicaban en los pacientes mayores de 80 años (Anexo VII tabla 16) así como en los no portadores de APOE  $\epsilon 4$  (Tabla 108)

En resumen, estos hallazgos nos permiten concluir que los portadores del alelo Pro72 tienen disminuido el riesgo de padecer EA, estos resultados son similares a los encontrados en el anterior estudio, por lo que presentan mayor consistencia y validez. Además confirman la importancia de los mecanismos de apoptosis en el desarrollo de la EA y abren la vía al empleo de fármacos reguladores de apoptosis en la prevención y tratamiento de la EA. Por otro lado en nuestro estudio, también se ha podido demostrar que la variante Arg72 aumenta el riesgo de EA. Esta hipótesis es plausible desde el punto de vista biológico, y creemos necesarios más estudios con mayor número de pacientes para certificar su validez.

Respecto a la DV, Gómez y cols. determinaron la relación entre el genotipo Arg/Arg del polimorfismo Arg72Pro con mal pronóstico funcional tras un ictus isquémico o hemorrágico. Además, demostraron en cultivos neuronales que la variante Arg72 posee capacidad para la activación de la vía apoptótica intrínseca, aumentando la vulnerabilidad de la muerte celular apoptótica inducida por isquemia. (68)

En 2017, Rodríguez y cols. determinaron que el polimorfismo Arg72Pro dictamina un pronóstico diferente tras una hemorragia intracerebral (HIC) a través de un mecanismo que involucra a células progenitoras endógenas de la médula ósea. Así han determinado que el alelo Pro72 del gen *TP53* está relacionado con la angiogénesis y con un mejor pronóstico

funcional tras la HIC, es decir, aquellos pacientes que al alta tenían un mRankin  $< 2$  lo mantenían y los que al alta tenían un mRankin  $> 2$  mejoraron a largo plazo su pronóstico funcional respecto a los portadores del alelo Arg72. Es más, aunque el volumen de la lesión y el volumen del edema peri-hematoma a las 48-72 h después de la HIC fueron similares en ambos genotipos, el volumen de cavidad residual era 4 veces menor en los pacientes Pro72 a los 6 meses tras la HIC en comparación con los portadores de Arg72. (214)

La restricción brusca en el suministro de sangre al cerebro causa una escasez de oxígeno y glucosa para mantener el metabolismo celular que desencadena una respuesta patológica. Paradójicamente, los episodios breves transitorios de isquemia controlada confieren protección contra una isquemia prolongada posterior. Este fenómeno descrito como pre-acondicionamiento cerebral (PC) se ha evidenciado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Recientemente, Ramos-Araque y cols. mostraron que las neuronas corticales que expresan la variante Pro72-p53 exhibían una mayor neuroprotección mediada por PC en comparación con neuronas Arg72-p53. (215)

Un trabajo previo al nuestro, realizado en 150 pacientes con DV, relacionaba la variante Pro72 con un menor riesgo de DV. Estos resultados, concordaban con lo publicado hasta la fecha en relación a este polimorfismo y la isquemia cerebral. Por ese motivo decimos replicar el estudio, pero con un mayor número de pacientes.

En nuestro estudio, observamos que el polimorfismo Arg72Pro del gen *TP53* se relaciona con el desarrollo de DV, ya que la presencia del alelo Pro disminuye en un tercio (0,63) la probabilidad de tener DV y con resultados estadísticamente significativos ( $p=0,026$ ), con independencia de la edad y del género. (Tabla 111)

Al análisis por subgrupos de edad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Anexo VII, tabla 17). Ser portador del alelo APOE  $\epsilon 4$ , no modifica el riesgo de DV.

Sin embargo, entre los que no portaban el alelo APOE  $\epsilon 4$  se observó que tanto en el modelo codominante como en el dominante ser portador del alelo Pro confería un efecto protector frente a la enfermedad siendo significativo en ambos casos ( $p=0,020$ ;  $p=0,016$ ).

Por otro lado, en el modelo recesivo, se objetivó que ser portador del alelo Arg confería un riesgo 3,38 veces mayor de padecer DV frente a los homocigotos para Pro ( $p=0,039$ ). (Tabla 112)

Al analizar por subtipo de DV, en los pacientes con DV cortical se apreció que los individuos portadores del alelo Pro en el modelo dominante tenían un riesgo menor de desarrollar la

enfermedad, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,039$ ). En el grupo de DV subcortical no se observaron diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 115)

Por otro lado, también se estudió la influencia del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo en los diferentes subtipos de DV. Se observó que entre los sujetos no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  aquellos con el alelo Pro en el modelo dominante presentaban un riesgo menor (0,55 veces menor) de padecer DV subcortical, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,041$ ). (Tabla 115)

Finalmente, se realizó un análisis de regresión logística ajustado a factores de riesgo clásicos en los pacientes con DV, y sus variantes frente al grupo control. Considerando el genotipo Arg/Arg de referencia, se observó que el hecho de ser portador del alelo Pro en los modelos codominante y dominante para el grupo de DV total y en el modelo dominante para el subgrupo de DV cortical se relaciona con un riesgo menor de padecer la enfermedad, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 116)

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en el estudio anterior. Este hecho, refuerza la hipótesis previa y establece la importancia de realizar más estudios que determinen la relación a los mecanismos de apoptosis y DV para determinar más factores que influyan en la prevención y tratamiento de la enfermedad.

#### **4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE GENES REPARADORES DEL DNA, *PrNP*, AUTOFAGIA Y *TP53* Y PROGRESIÓN EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Además de determinar la relación de los diferentes genes estudiados con el desarrollo tanto de EA como de DV, otro de los objetivos del presente trabajo era estudiar la influencia de los mismos en la progresión de la enfermedad. Para ello, se analizó la distribución genotípica de los polimorfismos según la progresión rápida o normal de la enfermedad de Alzheimer así como la influencia del alelo  $\epsilon 4$  del polimorfismo APOE en dicha distribución. Se definió como progresión rápida la disminución en puntuación MMSE  $\geq 4,5$  puntos al año.

Los factores genéticos que influyen en la progresión de la EA no son bien conocidos, incluso existe controversia en este sentido con respecto al APOE  $\epsilon 4$ .

Por un lado, puede estudiarse la velocidad de conversión de deterioro cognitivo leve (DCL) a EA. En este sentido, en 2013 Rodríguez y cols. estudiaron la influencia de 8 SNP (*ABCA7* rs3764650, *BIN1* rs744373, *CD2AP* rs9296559, *CLU* rs1113600, *CR1* rs1408077, *MS4A4E* rs670139, *MS4A6A* rs610932, y *PICALM* rs3851179) con la velocidad de conversión de

deterioro cognitivo moderado a EA, determinando que si bien individualmente no presentaban aumento de la velocidad de progresión, aquellos que presentaban seis o más alelos de riesgo progresaron dos veces más rápidamente a EA en comparación que aquellos que tenían menos de seis alelos de riesgo. (216)

Otros SNP relacionados con una progresión más rápida desde DLC a EA han sido SERPINA3 (rs4934) genotipo AA/AT, y CASP1 (rs580253) genotipo CT/TT. (217)

Por otro lado, también se puede evaluar la velocidad de progresión de la enfermedad una vez establecido el diagnóstico de EA. En este caso, un estudio realizado en 2015 por Wang and cols. observó una asociación entre *INPP5D*, *MEF2C*, *TREM2*, *EPHA1*, *PTK2B*, *FERMT2* y *CASS4* ( $p < 0,05$ ) con la progresión de la demencia. Sin embargo, ninguna de las asociaciones observadas mantuvo su significación después de ajustar por sexo, edad etc. (218)

Otro estudio realizado en 2014 por Peterson y cols. estudió la asociación entre las variantes de *PPP3R1*, rs1868402 y *MAPT*, rs3785883 y la velocidad de progresión de EA, estableciendo que cada SNP por separado no aumentaba la velocidad de progresión de EA mientras que los portadores de ambos loci de riesgo incrementaba en 2,9 veces el riesgo de progresión rápida respecto a los no portadores ( $p=0,0015$ ). Además, cuando combinaron los resultados de su estudio con otros similares observaron un empeoramiento un 30% más rápido en la escala CDR en los pacientes portadores de *MAPT*, rs3785883 ( $p=0,0082$ ), y una progresión 6 veces más rápida en los portadores de ambos loci de riesgo ( $p=0,0001$ ). (219)

### 4.1 GENES REPARADORES DE DNA

En nuestro estudio se estudiaron las influencias de los genes reparadores de DNA sobre la progresión de la EA una vez establecido el diagnóstico de EA. .

En nuestro estudio, ninguno de los polimorfismos relacionados con los genes reparadores de DNA se ha relacionado con una progresión más rápida de la enfermedad. Estos resultados no se modificaban al analizar según el estado de portador o no de APOE  $\epsilon 4$ . (Tabla 37, 39 y 41)

En el análisis de regresión logística no encontró asociación entre genotipo Arg/Arg del gen *XRCCC1*, genotipo Lys/Lys del gen *ERCC2* y genotipo Thr/Thr del gen *XRCC3* y una progresión más rápida de la enfermedad. (tabla 38,40 y 42)

Dado que en los estudios realizados hasta la fecha los SNP estudiados por separado no demostraban influir en la progresión, pero si el efecto aditivo de estos, sería interesante

estudiar en un futuro la presencia de estos polimorfismos junto con otros relacionados con el desarrollo de la EA como podría ser los polimorfismos relacionados con la autofagia.

### 4.1 GEN *PrNP*

También se analizó la influencia del polimorfismo Met129Val en la progresión rápida o normal de la EA.

En general, la progresión fue más rápida en los individuos Met/Val (25,0%) que en los individuos Met/Met (11,0%) o Val/Val (9,5%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,027$ ).

Estos resultados vuelven a diferir de lo publicado hasta la fecha. De este modo, un estudio italiano determinó que ser portador del genotipo Val/Val se relacionó con una progresión más rápida de la enfermedad. Es importante tener en cuenta que la influencia del polimorfismo Met129Val de PrPN sobre la progresión de la EA no ha sido muy estudiada y que probablemente sean necesarios más estudios para evaluar la influencia del mismo. (125)

Entre los portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , un 27,3% de los pacientes con EA portadores del genotipo Met/Val presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 10,7% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Met/Met y el 0% de los Val/Val, alcanzándose la significación estadística ( $p= 0,044$ ). En cambio, entre los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 63)

El análisis de regresión logística no encontró asociación entre el genotipo Val/Val y un menor riesgo de progresión rápida de la enfermedad. (Tabla 64)

En conclusión, por un lado, en nuestro estudio ser portador del genotipo Met/Val y ser APOE  $\epsilon 4$  negativo se relaciona con mayor riesgo de padecer EA.

Por otro lado, a pesar de que ser portador de APOE  $\epsilon 4$  no se relacione con mayor riesgo de padecer enfermedad, si parece que una vez establecida la enfermedad, ser portador de APOE  $\epsilon 4$  y portar el genotipo Met/Val confiere mayor riesgo de una progresión más rápida de la misma. Esto podría explicarse por el mecanismo propuesto por Calero y cols. donde la unión preferencial de APOE  $\epsilon 4$  a los oligómeros A $\beta$  favorece la acumulación de los mismos. A pesar de ello, estos resultados deben ser interpretados con cautela, ya que los sujetos con progresión rápida con genotipo Met/Val y portadores del APOE  $\epsilon 4$  en nuestro estudio no

fueron muy numerosos, por lo que sería necesario realizar este estudio en una cantidad mayor de pacientes para poder confirmar nuestros hallazgos.

### 4.2 GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA

En el caso de Thr300Ala de *ATG16L1*, en general, la progresión fue más rápida en los individuos portadores del genotipo Thr/Thr (30,2%) que en los individuos Thr/Ala o Ala/Ala (14%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,013$ ).

Al análisis según si eran portadores o no del alelo APOE  $\epsilon 4$ , en el grupo de los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$  un 32,1% de los pacientes con EA portadores del genotipo Thr/Thr presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 13,2% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Thr/Ala o Ala/Ala, siendo esta relación estadísticamente significativa ( $p=0,021$ ). (Tabla 73)

En el análisis por regresión logística ajustado por factores clásicos que habitualmente afectan a la progresión de la EA también se observó que el ser portador del genotipo Thr/Thr del gen *ATG16L1* constituye uno de los factores que se relacionaron con una progresión más rápida de la enfermedad ( $p=0,030$ ) (Tabla 74)

En el resto de genes relacionados con la autofagia no se encontró una asociación estadísticamente significativa en relación a la progresión de la EA. (Tabla 75, 78, 80 y 82) En el análisis de regresión logística no encontró asociación entre el genotipo CC del gen *ATG5*, CC del gen *ATG10* y CC del gen *ATG2B* y una progresión más rápida de la enfermedad. (Tabla 76, 79, 81 y 83)

En resumen, nuestro trabajo ha evaluado por primera vez la relación entre los genes relacionados con la autofagia y la progresión de la EA, estableciendo que el genotipo Thr/Thr del gen *ATG16L1* se relaciona con una progresión más rápida de la EA. En relación a los genes relacionados con la autofagia, el alelo Ala de *ATG16L1* se ha relacionado una disminución de la autofagia, lo cual produciría un mal funcionamiento de estos mecanismos y un mayor depósito de proteína A $\beta$  en el citosol de la neurona. Sin embargo, en las formas rápidamente progresivas se da un mayor acúmulo de sustancias nocivas en las neuronas, por lo que en estos casos la autofagia puede sobre-expresarse para intentar compensar este hecho. Eso explicaría que si bien el genotipo Thr/Thr del gen *ATG16L1* no se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar EA si se relaciona con una progresión más rápida de la enfermedad.

Serían necesarios estudios con un mayor número de pacientes para determinar claramente esta relación.

### 4.3 GEN *TP53*

En relación al polimorfismo Arg72Pro, en general, la progresión fue más rápida en los individuos Arg/Arg (21,4%) que en los individuos Arg/Pro o Pro/Pro (9,5%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,019$ ).

Al analizar estos resultados según el estado de APOE  $\epsilon 4$ , no se encontraron diferencias significativas entre los portadores. Sin embargo, entre los no portadores del alelo APOE  $\epsilon 4$ , un 23,7% de los pacientes con EA portadores del genotipo Arg/Arg presentaron una progresión rápida de la enfermedad frente al 7,3% de formas rápidas entre aquellos con genotipos Arg/Pro-Pro/Pro, siendo esta relación estadísticamente significativa ( $p=0,025$ ).

Este resultado, sería plausible desde el punto de vista biológico ya que se ha descrito que la variante Arg72 del gen *P53* en células en cultivo y líneas tumorales tiene mayor capacidad de inducir apoptosis que la variante Pro. Por esta razón, Pro se ha relacionado con una mayor longevidad, ya que al parecer los portadores de esta variante conservarían un mayor número de células madre en edades avanzadas, lo que produciría una mayor capacidad de renovación y homeostasis celular. (220) Por lo tanto ser portador de variante Arg72 podría relacionarse con una disminución de la longevidad de las neuronas así como de su homeostasis, produciendo de este modo una progresión más rápida de la enfermedad. Aun así, estos resultados deben interpretarse con cautela y deberían reproducirse en un tamaño muestral mayor.

### 4.4 ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Además se realizó un análisis de regresión logística donde se analizaron variables como edad, género, educación, depresión, psicosis, toma de medicación (anticolinésterasicos/memantina), el tiempo de seguimiento y ser portador o no de APOE  $\epsilon 4$ .

En el análisis de regresión logística se encontró asociación estadísticamente significativa entre rápida progresión y la psicosis, tratamiento con anticolinesterásicos y/o memantina, y tiempo de seguimiento tanto para genes reparadores de DNA, como para gen *PrNP*, genes relacionados con autofagia y *TP53*. (Tabla 38, 40, 42, 64, 74, 76, 79, 81, 83 y 110)

Con “psicosis” nos referimos a que los pacientes que presentaron síntomas psicóticos presentaron una progresión más rápida de la enfermedad que aquellos que no la presentaron. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios. Así, el *The Cache County Dementia Progression Study* demostró que la psicosis y/o los síntomas de la esfera psicótica incrementaban el riesgo de progresión rápida en casi 2 veces (hazard ratio = 2,007;  $p=0.028$ ). (220). Estos resultados también se observaron en otro estudio previo donde la psicosis también se relacionó con una progresión más rápida de la enfermedad (221)

Los inhibidores colinesterásicos y la memantina son fármacos empleados en la EA, ya que han demostrado en varios estudios randomizados que son útiles para disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad (222,223). En nuestro estudio, la variable tratamiento hace referencia a que los pacientes con progresión más rápida precisaban un mayor consumo de medicación, probablemente secundaria a la historia natural de la enfermedad, ya que al ser pacientes que empeoraban más rápido, era necesario tratarles de forma más agresiva.

En cuanto a la variable tiempo de seguimiento, nuestro estudio refleja que estos pacientes al tener una progresión rápida presentaban una mayor mortalidad, por lo que el tiempo de seguimiento en consulta era menor que el de los pacientes con EA de progresión normal. En el *The Cache County Dementia Progression Study* también se observó que los pacientes que manifestaban síntomas de la esfera psicótica presentaban una mortalidad 1,5 veces mayor (hazard ratio = 1,537;  $p=0.011$ ). Por lo tanto, si tenemos en cuenta que en nuestro estudio los síntomas psicóticos fueron más prevalentes en los pacientes con rápida progresión, es lógico pensar que también la mortalidad fue más elevada en este grupo y, por lo tanto, los tiempos de seguimiento menores respecto al grupo control. Por otro lado, otro estudio valoró la influencia de los factores de riesgo vascular en una progresión más rápida y en la mortalidad de la EA. Según este estudio, la DM y en menor medida la HTA se relacionaron con la supervivencia de la enfermedad; aun así, las diferencias observadas no pudieron atribuirse a dichos factores de riesgo. En nuestra serie, tal y como hemos comentado al principio de este capítulo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes subtipos de EA y la DM y la HTA, por lo que creemos que no han influido en gran medida en la mortalidad y, por lo tanto, en el tiempo de seguimiento. (224)

### **5. LIMITACIONES DEL ESTUDIOS**

Una de las principales limitaciones de nuestro estudio es el hecho de no tener confirmaciones anatómo-patológicas de los diagnósticos clínicos de EA y DV ni biomarcadores de beta-amiloide/tau en líquido cefalorraquídeo o PET-amiloide. Para minimizar la potencia de este hecho, se emplearon los criterios más estrictos y empleados mundialmente; así para el diagnóstico de DV se emplearon los criterios de la DMS-IV y los de NINDS-AIREN y para el diagnóstico de EA se emplearon los criterios de *National Institute on Aging y la Alzheimer's Association*. En la literatura publicada sobre el tema tratado en este trabajo, en muchas ocasiones tampoco se ha podido obtener confirmación anatómo-patológica o el apoyo de biomarcadores de beta-amiloide/tau –introducidos recientemente- y los diagnósticos han sido clínicos, por lo que consideramos que esta limitación no modifica la valoración de los resultados obtenidos.

Por otra parte, a pesar de que los controles empleados no tenían enfermedades neurológicas ni psiquiátricas, no eran controles “totalmente sanos” ya que procedían de consultas pre-anestésicas de oftalmología y traumatología. Esto fue así para poder tener tamaños muestrales comparables, ya que reclutar el número suficiente de controles sanos era difícil debido a que muchos sujetos no estaban dispuestos a realizarse pruebas de laboratorio y acudir a consulta expresamente para participar en estudios de casos-contrroles.

Por último, este estudio posee las limitaciones clásicas de cualquier estudio de casos y controles que analice polimorfismos genéticos. En primer lugar, los resultados obtenidos deben analizarse con cautela debido al tamaño muestral, especialmente para los subgrupos de DV y de EA. Para ello serían necesarios estudios de mayor tamaño muestral que confirmaran nuestro resultados. En el caso del polimorfismo Arg72Pro de P53 en este estudio se amplía la muestra empleada en el trabajo de la Dra. Manso confirmándose los resultados obtenidos en ella. Respecto al resto de polimorfismos, podemos determinar que aportan información relevante sobre patrones de asociación más que sobre causalidad definida. Por último, nuestros resultados no pueden extrapolarse a otras etnias debido a la variabilidad interétnica en la frecuencia de los SNP empleados así como a las diferentes prevalencias de los distintos tipos de demencias entre poblaciones asiáticas y occidentales, siendo necesarios nuevos estudios en los diferentes grupos étnicos.

### **6. DIRECTRICES PARA FUTUROS ESTUDIOS**

Los resultados de nuestro trabajo sugieren que los polimorfismos relacionados con la apoptosis, así como con la reparación de DNA, pueden variar en parte, la susceptibilidad al riesgo de padecer demencia. Por otro lado, el genotipo Thr/Thr del gen *ATG16L1* de la autofagia así como Arg/Arg del gen *TP53* se han relacionado con una progresión más rápida en el desarrollo de demencia por lo que podrían ser consideradas en el futuro para el desarrollo de nuevos biomarcadores que abrieran nuevas líneas de investigación para el diagnóstico precoz de la EA y de la DV. De modo similar, las proteínas codificadas por *XRCC3* y *TP53* deberían tenerse en cuenta en futuros trabajos sobre la prevención y el tratamiento de la DV.

## **CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES**

## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en nuestro estudio, confirman que los factores de riesgo cardiovascular influyen de forma significativa en el desarrollo de demencia vascular, así como de sus diferentes subtipos, por lo que un buen control de los mismos es fundamental para prevenir este tipo de demencia.
2. Nuestro trabajo refleja por primera vez que ser portador del alelo Met del polimorfismo Thr241Met del gen *XRCC3* se relaciona, con mayor riesgo de desarrollar Demencia Vascular. Consideramos que se deben realizar estudios en series más grandes de pacientes para confirmar su posible utilización tanto diagnóstica, como para el desarrollo de nuevos fármacos.
3. Los portadores del genotipo Met/Val del polimorfismo Met129Val y APOE  $\epsilon$ 4 negativo, presentan un riesgo casi 2 veces mayor de padecer Enfermedad de Alzheimer. Se requieren más estudios sobre el papel de APOE4 en relación con los oligómeros de PrP celular y PrPsc en el desarrollo de la enfermedad.
4. Los portadores del alelo anti-apoptótico Pro72 del gen *TP53* tienen disminuido el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer y Demencia Vascular, estos resultados son superponibles a los obtenidos en un estudio anterior, por lo que confirman la importancia de los mecanismos de apoptosis en el desarrollo de las demencias y abren la vía al empleo de fármacos reguladores de apoptosis en la prevención y tratamiento.
5. En relación al estudio de progresión de la EA, en este trabajo mostramos por primera vez que alelo pro-apoptótico Arg72 de *TP53*, el genotipo Thr/Thr de *ATG16L1* que predispone a la autofagia, y el genotipo Met/Val del gen *PrNP* se asocia significativamente con progresión más rápida de la Enfermedad de Alzheimer. Consideramos que se deben realizar estudios de estos polimorfismos en series más grandes de pacientes para confirmar su posible utilización como biomarcadores de pronóstico en esta enfermedad.

## **CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA**

### CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA:

1. JJ. Zarranz, *Neurología* 5ª edición Barcelona: Editorial Elsevier 2013, pp. 609-610
2. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.) DSM-V. Washington, DC (US): American Psychiatric Association, 2013.
3. World Health Organization. The ICD-10 Classification of mental and behavioural disorders. Geneva (Switzerland): World Health Organization, 1992.
4. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. 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. *Alzheimers Dement* 2011; 7:263-269.
5. Barquero M, Carnero Pardo C, Martinez Pardo MD. Clasificación. En: Molinuevo JL, Pena- Casanova J (eds). Guía Oficial SEN para la práctica clínica en demencias: conceptos, criterios y recomendaciones. Barcelona: Prous Science, 2009, pp. 51-60.
6. Instituto Nacional de Estadística: INEbase/ Demografía y población/ Cifras de población y Censos demográficos. Avance de la Explotación Estadística del Padrón a 1 de enero de 2014. URL:[http://www.ine.es/inebmenu/mnu\\_cifraspob.htm](http://www.ine.es/inebmenu/mnu_cifraspob.htm)
7. Organización Mundial de la Salud/ Centros de prensa/ Notas descriptivas. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
8. Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, et al. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 2000; 4(Suppl 5):S4-9.
9. Antonio Abellán García, Rogelio Pujol Rodríguez, Un perfil de las personas mayores en España, 2015 Indicadores estadísticos básicos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Centro de Ciencias Humanas y Sociales (CCHS). Envejecimiento en red. ISSN: INFORMES envejecimiento 2340-566X
10. Barquero M, Carnero Pardo C, Martinez Pardo MD. Clasificación. En: Molinuevo JL, Pena- Casanova J (eds). Guía Oficial SEN para la práctica clínica en demencias: conceptos, criterios y recomendaciones. Barcelona: Prous Science, 2009, pp. 243-263.
11. Manzano S, Bello J, Manso-Calderón R. Guía oficial SEN diagnóstica y terapéutica en Demencias 2018. ISBN: 978-84-17372-34-7, pp 153-154

12. Jellinger KA. Morphologic diagnosis of “vascular dementia” - A critical update. *J Neurol Sci* 2008; 270:1–12.
13. Martínez-Lage P. Demencias vasculares. En: Martí-Vilalta JL (eds). Enfermedades vasculares cerebrales. 2a ed. Barcelona: Prous Science, 2004, pp. 411-433.
14. Robert Perneczky, Oren Tene, Johannes Attems, Panteleimon Ginnakopoulos, M. Arfan Ikram, Antonio Federico, Marie Sarazin and Lefkos T. Middleton. Is the time ripe or new diagnostic criteria of cognitive impairment due to cerebrovascular disease? Consensus report of the International Congress on Vascular Dementia working group. *BMC Medicine* (2016) 14:162
15. Hachinski VC, Ilif LD, Silhka E, et al. Cerebral blood in dementia. *Arch. Neurol.* 1975 32:632-637
16. M. Arfan Ikram, Anna Bersano, Raquel Manso-Calderón, Jian-Ping Jia, Helena Schmidt, Lefkos Middleton, Benedetta Nacmias, Saima Siddiqi and Hieab H.H. Adams. Genetics of vascular dementia – review from the ICVD working group. *BMC Medicine* (2017) 15:48
17. Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, et al. Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* 1997; 350: 1511-1515.
18. Barquero M, Carnero Pardo C, Martínez Pardo MD. Clasificación. En: Molinuevo JL, Peña-Casanova J (eds). Guía Oficial SEN para la práctica clínica en demencias: conceptos, criterios y recomendaciones. Barcelona: Prous Science, 2009, pp. 61-85
19. Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739(2-3):198-210.
20. Guy M. McKhann, David S. Knopman, Howard Chertkow, Bradley T. Hyman, Clifford R. Jack Jr., Claudia H. Kawas, William E. Klunk, Walter J. Koroshetz, Jennifer J. Manly, Richard Mayeux, Richard C. Mohs, John C. Morris, Martin N. Rossor, Philip Scheltens, Maria C. Carrillo, Bill Thies, Sandra Weintraub, and Creighton H. Phelps. 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. *Alzheimers Dement.* 2011 May ; 7(3): 263–269
21. López de Munain Arregui AJ. Enfermedad de Alzheimer genéticamente determinada. En: Alberca R, López-Pousa (eds). Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. 4a ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana 2011, pp. 243-253.

22. Lleo A, Berezovska O, Growdon JH, et al. Clinical, pathological, and biochemical spectrum of Alzheimer disease associated with PS-1 mutations. *Am J Geriatr Psychiatry* 2004; 12(2):146-156.
23. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, et al. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010; 23(4):213-227
24. Brouwers N, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Ann Med* 2008; 40(8):562-583.
25. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 2009; 41(10):1088-1093.
26. Jose A. Santiago, Virginie Bottero and Judith A. Potashkin. Dissecting the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative. Diseases through Network Biology. *Frontiers in Aging Neuroscience* | www.frontiersin.org 1 May 2017 | Volume 9 | Article 166
27. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461:1071-8.
28. Zhou C, Zhou Y, Li J et al. The Arg194Trp polymorphism in the X-ray repair crosscomplementing group 1 gene as a potential risk factor of oral cancer: a meta-analysis. *Tohoku J Exp Med*. 2009; 219:43-51.
29. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, et al. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*. 2008; 113:1953-68.
30. S. Dogru-Abbasoglu, G. Aykaç-Toker, H.A. Hanagasi, H. Gürvit, M. Emre, M. Uysal. The Arg194Trp polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and the risk for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Neurol Sci* (2007) 28:31-34
31. Fousteri M, Mullenders LH. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res*. 2008; 18:73-84.
32. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1:22-33.
33. Melis JP, Van Steeg H, Luijten M. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antiox. Redox. Signal*. Jun 20;18(18):2409-19 (2013)
34. Fromme JC, Verdine GL. Base excision repair. *Adv Protein Chem*. 2004; 69:1- 41.

35. Fortini P, Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)*. 2007; 6:398-409.
36. Kim YJ, Wilson DM, 3rd. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5:3-13
37. Mansour Akbari, Marya Morevati, Deborah Croteau, Vilhelm A. Bohr. The role of DNA base excision repair in brain homeostasis and disease. *DNA Repair* Aug; 32:172-179 (2015)
38. O'Driscoll M, Jeggo PA. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet*. 2006; 7:45-54.
39. Dharmendra Kumar Singh, Avik K. Glosch, Deborah L. Croteau, Vilhelm A. Bohr. ReQhelicases in DNA double strand break and telomere maintenance. *Mutat Res*. Aug 1: 736(1-2):15-24 (2012)
40. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev*. 2006; 106:302-23.
41. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 2008; 18:85-98.
42. Pena-Diaz J, Jiricny J. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone Trends *Biochem Sci*. 2012; 37:206-14.
43. Ladiges WC. Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. *Oncogene* 25:1612-1619, 2006.
44. Hang B. Base Excision Repair, in Wei Q. LL, and Chen D., (ed): DNA repair, genetic instability and cancer. London, *World Science*, 2007, pp 23-64.
45. Hu Z, Ma H, Chen F, et al. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1810-8, 2005
46. Kwiatkowski D, Czarny P, Galecki P et al. Variants of Base Excision Repair Genes MUTYH, PARP1 and XRCC1 in Alzheimer's disease Risk. *Neuropsychobiology*. 2015; 71:176-186.
47. Gürdan Orhan, Aylin Elkama, Semra Öztürk Mungan, Esra Eruyar, Bensu Karahalil. The impact of detoxifying and repair gene polymorphisms on oxidative stress in ischemic stroke. *Neurol Sci*. (2016) 37:955-961
48. Hann-Yeh Shyu, Jia-Ching Shieh, Ji-Ho Lin, Hsiao-Wei Wang and Chu-Wen Cheng. Polymorphisms of DNA Repair Pathway Genes and Cigarette Smoking in relation to susceptibility to Large Artery Atherosclerotic Stroke among Ethnic Chinese in Taiwan. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. Vol 19 nº4

49. Somdat Mahabir, Christian C Abnet, You-Lin Qiao, Luke D Ratnasingle, Sanford M Dawsey, Zhi-Wei Dong, Philip R Taylor, Steven D Mark. A prospective study of polymorphisms of DNA repair genes XRCC1, XPD23, and APE/ref-1 and risk of stroke in Lixian, China. *J Epidemiol Community Health* 2007; 61:737-741
50. Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, et al: The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Embo J* 13:2388-92, 1994
51. Clarkson SG, Wood RD. Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal. *DNA Repair (Amst)* 4:1068-74, 2005
52. Broughton BC, Steingrimsdottir H, Lehmann AR. Five polymorphisms in the coding sequence of the xeroderma pigmentosum group D gene. *Mutat Res* 362:209-11, 1996
53. Monaco R, Rosal R, Dolan MA, et al. Conformational effects of a common codon 751 polymorphism on the C-terminal domain of the xeroderma pigmentosum D protein. *J Carcinog* 8:12, 2009
54. Kean-Cowdin R, Barnholtz-Sloan J, Inskip PD et al. Associations between polymorphisms in DNA repair genes and glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:1118-1126
55. Mitra AK, Singh N, Garg VK, Chaturvedi R, Sharma M, Rath SK. Statistically significant association of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs13181 (ERCC2) with predisposition to Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck (SCCHN) and Breast cancer in the north Indian population. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009; 28:104.
56. Semra Dogru-Abbasoglu, Muzeyyen Inceoglu, Hande Parildar-Karpuzoglu, Hasmet A. Hanagasi, Berrin Karadag , Hakan Gurvit , Murat Emreb, Gulcin Aykac-Toker , Mujdat Uysal. Polymorphisms in the DNA repair genes XPD (ERCC2) and XPF (ERCC4) are not associated with sporadic late-onset Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 404 (2006) 258–261
57. Nagaraju G, Hartlerode A, Kwok A, et al: XRCC2 and XRCC3 regulate the balance between short- and long-tract gene conversions between sister chromatids. *Mol Cell Biol* 29:4283-94, 2009
58. Krupa R, Synowiec E, Pawlowska E, et al: Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. *Exp Mol Pathol* 87:32-5, 2009
59. Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH: Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect* 111:1843-50, 2003

60. Garcia-Closas M, Newcomb P, et al. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland and meta-analyses. *Human Genetics*, 2006
61. de las Penas R. S-RM, Alberola V, et al. Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine treated non-small cell lung cancer patients. *Annals of Oncology* 17:668-675, 2006
62. Mariana Varna, Guilhem Bousquet, Louis-François Plassa, Philippe Bertheau, Anne Jannin. TP53 Status and Response to Treatment in Breast Cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 284584 (2011)
63. Murphy M E. Polymorphic variants in the p53 pathway. *Cell Death Differ* 2006; 13:916-920
64. Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene* 2006; 25:1602-1611.
65. Gomez-Sanchez JC, Delgado-Esteban M, Rodriguez-Hernandez I, et al. The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *J Exp Med* 2011; 208(3):429-437.
66. Martinez-Lucas P, Moreno-Cuesta J, Garcia-Olmo DC, et al. Relationship between the Arg72Pro polymorphism of p53 and outcome for patients with traumatic brain injury. *Intensive Care Med* 2005; 31(9):1168-1173.
67. Ovais Shafi. Inverse relationship between Alzheimer's disease and cancer, and other factors contributing to Alzheimer's disease: a systematic review. *BMC Neurology* (2016) 16:236
68. Scacchi R, Gambina G, Moretto G, et al. Association study between P53 and P73 gene polymorphisms and the sporadic late-onset form of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2009; 116(9):1179-1184.
69. Mădălina Fîlfan, Raluca Elena Sandu, Alexandra-Daniela Zăvăleanu, Andrei Greșiță, Daniela-Gabriela Glăvan, Denissa-Greta Olaru, Aurel Popa-Wagner. Autophagy in aging and disease. *Rom J Morphol Embryol* 2017, 58(1):27–31
70. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27–42 (2008).
71. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 458–467 (2009).
72. Autophagy and Innate Immunity. *Review InvivoGen*. March 2017. [www.invivogen.com](http://www.invivogen.com)

73. Pyo, J. O., Nah, J. & Jung, Y. K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp. Mol. Med.* 2014; 44, 73–80.
74. Chen, Y. & Klionsky, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* 2011; 124, 161–170.
75. Choi M.D. et al Autophagy in Human Health and Disease. *N Engl J Med* 2013 7, 368.
76. Munson, M. J. & Ganley, I. G. MTOR, PIK3C3, and autophagy: Signaling the beginning from the end. *Autophagy* 11, 2375–2376 (2015).
77. Fimia a et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature Lett* 447; 28, 1121-1125 (2007)
78. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T: Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 2003,11:1679-1688.
79. Burman C, Ktistakis NT: Autophagosome formation in mammalian cells. *Semin Immunopathol* 2010, 32(4):397-413.
80. Shen H, Mizushima et al. At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem Sci* 2014 39, 61-71
81. Moreau k et al. Connections between SNAREs and autophagy. *Trends Biochem Sci* 2013; 38, 57-63
82. Menzies F et al. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews* 2015; 16, 345-357
83. Autophagy in Alzheimer's Disease Ameneh Zare-shahabadi, Eliezer Masliah, Gail V.W. Johnson, and Nima Rezaei. *Rev Neurosci.* 2015 ; 26(4): 385–395.
84. Pickford F et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid  $\beta$  accumulation in mice. *J clin Invest* 2008, 118, 2190-2199
85. Jaeger p. Beclin 1 Complex in Autophagy and Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 2010; 67, 1181-1184
86. Lee J et al. Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations. *Cell* 2010; 141, 1146-1158
87. Spilman P et al. Inhibition of mTOR by Rapamycin Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid- $\beta$  Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 2010 5

88. Tian Y et al. A smallmolecule enhancer of autophagy decreases levels of Abeta and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. *FASEB J* 2011. 25, 1934-1942
89. Steele J, Gandy S. Latrepirdine (Dimebon), a potential Alzheimer therapeutic, regulates autophagy and neuropathology in an Alzheimer mouse model. *Autophagy* 2013; 9, 617-618
90. Forlenza O.V. et al. Does lithium prevent Alzheimer's disease? *Drugs Aging* 2012 29, 335-342.
91. Vingtdeux V. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J. Biol. Chem.* 2010; 285, 9100-9113.
92. Martini H. The Autophagy-Lysosomal Pathway in Neurodegeneration: A TFEB Perspective. *Trends Neurosci* 2016; 39(4), 221-234
93. Liu D et al. Nicotinamide forestalls pathology and cognitive decline in Alzheimer mice: evidence for improved neuronal bioenergetics and autophagy procession. *Neurobiol. Aging* 2013; 34, 1564-1580.
94. Neuronal autophagy in cerebral ischemia- a potential target for neuroprotective strategies? Bozena Gabryel, Alicja Kost, Daniela Kasprowska. *Pharmacological Reports* 2012, 64, 1-15.
95. Hurst, D. R. et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 69, 1279–1283 (2009).
96. Murthy, A. et al. A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* 506, 456–462 (2014).
97. Qin, Z. et al. Potentially functional polymorphisms in ATG10 are associated with risk of breast cancer in a Chinese population. *Gene* 527, 491–495 (2013).
98. Plantinga, T. S. et al. Role of genetic variants of autophagy genes in susceptibility for non-medullary thyroid cancer and patients outcome. *PloS One* 9, e94086 (2014).
99. Andrés Castellanos, Marta Pérez Prieto, Javier Castrodeza , José Antonio Mirón Canelo y Rogelio González Sarmiento. El polimorfismo M129Vdel gen PRNP en la población de Castilla y León presenta una distribución similar a otras regiones de España y países europeos. *Medicina Clínica* 134(6):254–256 (2010)
100. Sales N, Rodolfo K, Hassig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL. Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *The European journal of neuroscience.* 10:2464-2471 (1998)
101. Aguzzi A, Sigurdson C, Heikenwaelder M. Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annual Review of Pathology* 3:11-40 (2008)

102. Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. Cellular prion protein binds laminin and mediate neuritogénesis. *Molecular Brain Research* 76:85-92 (2000)
103. Schrock Y, Solis GP, Stuermer C. Regulation of focal adhesión formation and filopodia extensión by the celular prion protein (PrPc). *FEBS letters* 583:389-393 (2009)
104. Tremblay, P., Bouzamondo-Bernstein, E., Heinrich, C., Prusiner, S.B. and DeArmond, S.J. Developmental expression of PrP in the postimplantation embryo. *Brain Research* 30:60–67. (2007)
105. Steele, A.D., Lindquist, S. and Aguzzi, A. The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion* 1: 83–93.(2007)
106. Clinton J, Forsyth C, Roysten MC, Roberts GW. Synaptic degeneraton is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminar study. *Neuroreport* 4:65-68 (2003)
107. Vasallo N, Helms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *Journal of neurochemistry* 86:538-544 (2003)
108. Keshet GL, Bar-Peled O, Yaffe D, Nudel U, Gabizen R. The celular prion protein colocalizes with the dustroglican complex in the brain. *Journal of chemisry* 75:1889-1897 (2000)
109. Beraldo FH, Arantes CP, Santos TG et al. Metabopatic glutamate receptors transduce signals for neurite outgrowth after binding of the prion protein to laminin gamma1chain. *FASEB journal* 25:265-279 (2011)
110. Fournier JG. Cellular prion protein electron microscopy: attempts/limits and clues to synaptic trait. Implications in neurodegeneratin process. *Cell and tissue research* 332:1-11 (2008)
111. Mehta A, Prabhakan M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity Bridge to various trigger in neurodegenerative disorders. *European journal of pharmacology* 698:6-18 (2013)
112. Chiarinini LB, Freitar AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion transduces neuroprotective signals. *The EMBO journal* 21:3317-3326 (2002)
113. Brown DR, Nicholas RS, Canevari L. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *Journal of neuroscience research* 67:211-224 (2002)

114. Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *The journal of biological chemistry* 276:39145-39149 (2001)
115. Diego La Mendola, Enrico Rizzarelli. Evolutionary Implications of Metal Binding Features in Different Species' Prion Protein: An Inorganic Point of View. *Biomolecules* 4:546-565 (2014)
116. Sage C. Arbor, Mike LaFontaine, Medhane Cumbay. Amyloid-beta Alzheimer targets — protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale Journal of Biology and Medicine* Mar. 89;5-21 (2016)
117. Takashi Onodera. Dual role of cellular prion protein in normal host and Alzheimer's disease. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 93 (2017)
118. Nah, J., Pyo, J.O., Jung, S., Yoo, S.M., Kam, T.I., Chang, J.W., Han, J., An, S.S.A., Onodera, T. and Jung, Y.K. BECN1/Beclin is recruited into lipid rafts by prion to activate autophagy in response to amyloid A $\beta$ . *Autophagy* 9, 2009–2022. (2013)
119. Dermaut B, Croes EA, Rademakers R, et al. PRNP Val 129 homozygosity increases risk for early-onset Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 2003; 53: 409–412.
120. Gacia H, Safranow K, Styczynska M, et al. Prion protein gene M129 allele is a risk factor for Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* 2006; 113: 1747–1751.
121. Golanska E, Hulas-Bigoszewska K, Rutkiewicz E, et al. Polymorphisms within the prion (PrP) and prion-like protein (Doppel) genes in AD. *Neurology* 2004; 62: 313–315.
122. Casadei VM, Ferri C, Calabrese E, et al. Prion protein gene polymorphism and Alzheimer's disease: one modulatory trait of cognitive decline? *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2001; 71: 279–280.
123. Li X, Rowland LP, Mitsumoto H, et al. Prion protein codon 129 genotype prevalence is altered in primary progressive aphasia. *Annals of Neurology* 2005; 58: 858–864.
124. Ohkubo T, Sakasegawa Y, Asada T, et al. Absence of association between codon 129/219 polymorphisms of the prion protein gene and Alzheimer's disease in Japan. *Annals of Neurology* 2003; 54: 553–554.
125. Del Bo R, Scarlato M, Ghezzi S, et al. Is M129V of PRNP gene associated with Alzheimer disease? A case-control study and metaanalysis. *Neurobiol Aging* 2006; 27:770-775.

126. A. Poleggi, A. Bizzarro, A. Acciarri, P. Antuono, S. Bagnoli, E. Cellini, G. Dal Forno, C. Giannattasio, A. Lauria, M. G. Matera, B. Nacmias, M. Puopolo, D. Seripa, S. Sorbi, D. R. Wekstein, M. Pocchiari, C. Masullo. Codon 129 polymorphism of prion protein gene in sporadic Alzheimer`s disease. *European Journal of Neurology*. 15: 173–178 (2008)
127. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12:189-198.
128. Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, et al. Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2001;56(9):1133-1142.
129. Ictus: guía de práctica clínica. URL: <http://www.gencat.cat/salut/depsan/units/aatrm/pdf/gp05ictuses.pdf>
130. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kapelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24:35-41.(1993)
131. Hughes CP, Berg L, Danzinger WL, et al. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry* 140:556-572 (1982)
132. Morris JC. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology* 43: 2412-2414 (1993)
133. Blesa R, Pujol M, Aguilar M, et al. Clinical validity of the 'Mini-Mental State' for Spanish speaking communities. *Neuropsychologia* 2001; 39:1150–1157.
134. Cortes F, Nourhashemi F, Guerin O, Cantet C, Gillette-Guyonnet S, Andrieu S, Ousset PJ, Vellas B; REAL-FR Group. Prognosis of Alzheimer`s disease today: a two-year prospective study in 686 patients from the REAL-FR Study. *Alzheimers Dement* 4(1), 22-29. (2008)
135. Cummings JL, Mega M, Gray K, et al. The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* 44:2308-2314. (1994)
136. Beatriz Castaño Monsalve, Montserrat Bernabeu Guitart, Raquel López, Antoni Bulbena Vilasar y Jose Ignacio Quemada. Perfil psicopatológico de pacientes con traumatismo craneoencefálico evaluados mediante el Inventario Neuropsiquiátrico. *Rev Psiquiatr Salud Ment (Barc.)*;5(3):160-166 (2012)

137. Wahlund LO, Barkhof F, Fazekas F, et al. A new rating scale for age-related White matter changes applicable to MRI and CT. *Stroke* 32:1318-1322. (2001)
138. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354. (1985)
139. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350. (1987)
140. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27:95-125. (2006)
141. Higuchi R, Dolling G, Watson R. PCR-analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11:1026-1030, (1993)
142. Ma H, Chen G, Quiao T, Chuang M. Application of real-time polymerase chain reaction. *The Journal of American Science* 2:1-15, (2006)
143. Ruiz A, Hernandez I, Rosende-Roca M, et al. Exploratory analysis of seven Alzheimer's disease genes: disease progression. *Neurobiol Aging* 2013; 34(4): 1310-1317
144. Sujuan Gao, PhD; Hugh C. Hendrie, MB, ChB; Kathleen S. Hall, PhD; et al. The Relationships Between Age, Sex, and the Incidence of Dementia and Alzheimer Disease A Meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55(9):809-815
145. Andersen K, Launer LJ, Dewey ME, et al. Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology* 1999; 53(9):1992-1997
146. AR Borenstein, PhD, Y Wu, PhD, JD Bowen, MD, WM McCormick, MD, J Uomoto, PhD, SM McCurry, PhD, G Schellenberg, PhD, and EB Larson, MD. Incidence Rates of Dementia, Alzheimer's disease and Vascular Dementia in the Japanese American Population in Seattle, WA: The *Kame* Project. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2014 ; 28(1): 23–29.
147. Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, et al. Incidence and risk of dementia. The Rotterdam Study. *American journal of epidemiology*. 1998; 147(6):574–580
148. Laia Calvó-Perxas, M. Teresa Osuna, Jordi Gich, Eréldo Eligio-Hernández, Marta Linares, Marta Viñas, Isabel Casas, Oriol Turró-Garriga, Secundino López-Pousa, Josep Garre-Olmo, en representación del Grupo de Estudio del Registro de Demencias de Girona. Características clínicas y demográficas de los casos de demencia

- diagnosticados en la Región Sanitaria de Girona durante el período 2007-2010: datos del Registro de Demencias de Girona (ReDeGi) *Rev Neurol* 2012; 54 (7): 399-406
149. Andrade C. Demencia y mujer. En: *I Curso sobre patología neurológica en la mujer*, Vigo, España, 9-10 febrero 2007. *Sociedade Galega de Neuroloxía*; 2007. pp. 55-65.
150. Rocca WA, Henderson VW. Is there a link between gynecologic surgeries and Alzheimer disease? *Neurology*. 2014; 82:196–7
151. Walter A. Rocca, MD, MPH, Michelle M. Mielke, Ph.D., Prashanthi Vemuri, Ph.D., and Virginia M. Miller, Ph.D. Sex and gender differences in the causes of dementia: a narrative review. *Maturitas*. 2014 October ; 79(2): 196–201
152. Jessica L. Podcasy, MS; C. Neill Epperson, MD Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues in Clinical Neuroscience* - Vol 18 . No. 4 . 2016
153. F. Bermejo-Pareja , J. Benito-León , S. Vega , M.J. Medrano , G.C. Román on behalf of the Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. *Journal of the Neurological Sciences* 264 (2008) 63–72
154. Staekenborg SS, van Straaten EC, van der Flier WM, et al. Small vessel versus large vessel vascular dementia: risk factors and MRI findings. *J Neurol* 2008; 255(11):1644- 1651; discussion 1813-1814.
155. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 2013; 80(19):1778-1783
156. Josep Garre-Olmo. Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Rev Neurol* 2018; 66 (11): 377-386
157. Jellinger KA, Attems J. Prevalence and pathology of vascular dementia in the oldest-old. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(4):1283-93
158. May A Beydoun, Hind A Beydoun, Alyssa A Gamaldo, Alison Teel, Alan B Zonderman, and Youfa Wang. Epidemiologic studies of modifiable factors associated with cognition and dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2014; 14: 643.
159. Meng X, D'Arcy C. Education and dementia in the context of the cognitive reserve hypothesis: a systematic review with meta-analyses and qualitative analyses. *PLoS One* 2012; 7(6):e38268

160. Marialuisa Perrotta, Giuseppe Lembo, and Daniela Carnevale. Hypertension and Dementia: Epidemiological and Experimental Evidence Revealing a Detrimental Relationship. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 347
161. Costantino Iadecola, M.D. Best papers in hypertension: Hypertension and dementia. *Hypertension*. 2014 July ; 64(1): 3–5
162. S. Yasar, J. Xia, W. Yao, et al., Antihypertensive drugs decrease risk of Alzheimer disease: Ginkgo Evaluation of Memory Study, *Neurology* 81 (2013) 896–903.
163. C. Tzourio, C. Anderson, N. Chapman, et al., PROGRESS collaborative group Effects of blood pressure lowering with perindopril and indapamide therapy on dementia and cognitive decline in patients with cerebrovascular disease, *Arch. Intern. Med.* 163 (2003) 1069–1075.
164. S. Zhuang, J. Li, X. Wang, et al., Renin–angiotensin system-targeting antihypertensive drugs and risk of vascular cognitive impairment: a meta-analysis, *Neurosci. Lett.* 615 (2016) 1–8.
165. Yi-Chun Kuan, Kuang-Wei Huang, Der-Jen Yen, Chaur-Jong Hu, Cheng-Li Lin, Chia-Hung Kao Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers reduced dementia risk in patients with diabetes mellitus and hypertension. *International Journal of Cardiology* 220 (2016) 462–466
166. Jing Jing, MD, PhD; Yuesong Pan, MD; Xingquan Zhao, MD, PhD; Huaguang Zheng, MD, PhD; Qian Jia, MD, PhD; et al. Prognosis of Ischemic Stroke With Newly Diagnosed Diabetes Mellitus According to Hemoglobin A1c Criteria in Chinese Population. *Stroke* 2016 47(8):2038-44
167. Graydon S. Meneilly MD, FRCPC, FACP, Daniel M. Tessier MD, FRCPC. Diabetes, Dementia and Hypoglycemia. *Can J Diabetes* 40 (2016) 73–76
168. Mayeda ER, Whitmer RA, Yaffe K. Diabetes and cognition. *Clin Geriatr Med* 2015;31:101–15.
169. Ninomiya T. Diabetes mellitus and dementia. *Curr Diab Rep* 2014;14:487
170. Xiaohua Li, Dalin Song, and Sean X Leng. Link between type 2 diabetes and Alzheimer’s disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clin Interv Aging*. 2015; 10: 549–560
171. Dore GA, Elias MF, Robbins MA, et al. Presence of the APOE epsilon4 allele modifies the relationship between type 2 diabetes and cognitive performance: The Maine-Syracuse Study. *Diabetologia* 2009;52:2551–60.

172. Launer LJ, Miller ME, Williamson JD, et al. Effects of intensive glucose lowering on brain structure and function in people with type 2 diabetes (ACCORD MIND): A randomized open-label substudy. *Lancet Neurol* 2011;10:969–77.
173. Angela Marie Abbatecola MD, PhD, Mario Bo MD , Mario Barbagallo MD , Raffaele Antonelli Incalzi MD , Alberto Pilotto MD , Giuseppe Bellelli MD , et al, on behalf of the Italian Society of Gerontology and Geriatrics (SIGG), Florence, Italy. Severe Hypoglycemia Is Associated With Antidiabetic Oral Treatment Compared With Insulin Analogs in Nursing Home Patients With Type 2 Diabetes and Dementia: Results From the DIMORA Study. *JAMDA* 16 (2015) 349.e7e349.e12
174. Notkola, I.L., Sulkava, R., Pekkanen, J., Erkjuntti, T., Ehnholm, C., Kivinen, P. et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein e epsilon 4 allele, and alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* (1998) 17, 14–20
175. Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J. and Whitmer, R.A Midlife serum cholesterol and increased risk of alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* (2009) 28, 75–80
176. Mielke, M.M., Zandi, P.P., Shao, H., Waem, M., Ostling, S., Guo, X. et al. The 32-year relationship between cholesterol and dementia from midlife to late life. *Neurology* (2010) 75, 1888–1895
177. Jason P. Appleton, Polly Scutt, Nikola Sprigg and Philip M. Bath. Hypercholesterolaemia and vascular dementia *Clinical Science* (2017) 131 1561–1578
178. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease. *Lancet* 2011; 377:1019-1031
179. Trompet, S., van Vliet, P., de Craen, A.J., Jolles, J., Buckley, B.M., Murphy, M.B. et al. Pravastatin and cognitive function in the elderly. Results of the prosper study. *J. Neurol.* (2010) 257, 85–90
180. Heart Protection Study Collaborative Group Mrc/bhf heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* (2002) 360, 7–22
181. Letenneur L, Larrieu S, Barberger-Gateau P: Alcohol and tobacco consumption as risk factors of dementia: a review of epidemiological studies. *Biomed Pharmacother* 2004, 58:95–99.
182. Kalmijn S, van Boxtel MP, Verschuren MW, Jolles J, Launer LJ: Cigarette smoking and alcohol consumption in relation to cognitive performance in middle age. *Am J Epidemiol* 2002, 156:936–944.

183. Jia-Hao Suna, Lan Tana, Hui-Fu Wangb, Meng-Shan Tana, et al. Genetics of Vascular Dementia: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis.* 2015;46(3):611-2
184. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011; 2(9):2672-2713.
185. Weisgraber KH, Rall SC Jr and Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem* 1981; 256: 9077-9083.
186. Rohn TT. Proteolytic cleavage of apolipoprotein e4 as the keystone for the heightened risk associated with Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 14908-14922
187. Troy T Rohn. Is apolipoprotein E4 an important risk factor for vascular dementia? *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(7):3504-3511
188. Hirschhorn JN, Daly MJ: Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6:95-108, 2005
189. Lovell MA, Xie C, Markesbery WR Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* (2000) 855:116–123
190. Parildar-Karpuzoğlu H, Dođru-Abbasođlu S, Hanagasi HA, Karadađ B, Gürvit H, Emre M, Uysal M. Single nucleotide polymorphisms in base-excision repair genes hOGG1, APE1 and XRCC1 do not alter risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2008 Sep 19;442(3):287-91
191. Wei He, Peng Huan , Dinghua Liu, Lingling Zhong , Rongbin Yu , and Jianan Li Polymorphism of the XRCC1 Gene Is Associated with Susceptibility and Short-Term Recovery of Ischemic Stroke *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2016, 13, 1016
192. Nina Bucholtz, Ilja Demutha. DNA-repair in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *DNA Repair* 12 (2013) 811–816
193. V. Davydov, L.A. Hansen, D.A. Shackelford, Is DNA repair compromised in Alzheimer's disease? *Neurobiology of Aging* 24 (2003) 953–968.
194. D.A. Shackelford, DNA end joining activity is reduced in Alzheimer's disease, *Neurobiology of Aging* 27 (2006) 596–605.
195. Maria Grazia Andreassi, MSC, PHD, Emanuela Piccaluga, MD,y Luna Gargani, MD, PHD,Laura Sabatino, MSC, PHD, et al. Subclinical Carotid Atherosclerosis and Early

- Vascular Aging From Long-Term Low-Dose Ionizing Radiation Exposure A Genetic, Telomere, and Vascular Ultrasound Study in Cardiac Catheterization Laboratory Staff. *Jacc: cardiovascular interventions* vol. 8, no. 4, 2015
196. Gokkusu C, Cakmakoglu B, Dasdemir S, Tulubas F, Elitok A, Tamer S, Seckin S, Umman B Association between genetic variants of DNA repair genes and coronary artery disease. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013 Apr;17(4):307-13
  197. Andi Ariyandy, Chiemi Saka, Mari Ishida, Ryusei Mizut, Kiyoshi Miyagawa, Satoshi Tashiro, et al. XRCC3 polymorphism is associated with hypertension-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension Research* (2018) 41:426–434
  198. Casadei VM, Ferri C, Calabrese E, et al. Prion protein gene polymorphism and Alzheimer's disease: one modulatory trait or cognitive decline? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:278-283
  199. Combarros O, Sánchez-Guerra M, Llorca J, Alvarez-Arcaya A, Berciano J, Peña N, Fernández-Viadero C. Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene is not associated with sporadic AD. *Neurology*. 2000 Aug 22;55(4):593-5.
  200. Jerusa Smid , Michele Christine Landemberge Codon 129 polymorphism of prion protein gene in is not a risk factor for Alzheimer's disease Jerusa Smid , Michele Christine Landemberge. *Arq Neuropsiquiatr* 2013;71(7):423-427
  201. Ahn K, Kim E, Kwon YA, Kim DK, Lee JE, Jo SA. No association of prion protein gene polymorphisms with Alzheimer's disease in Korean population. *Exp Mol Med*. 2006 Dec 31;38(6):727-31
  202. Calero O, Bullido MJ, Clarimón J, Frank-García A, Martínez-Martín P, et al. Genetic Cross-Interaction between APOE and PRNP in Sporadic Alzheimer's and Creutzfeldt-Jakob Diseases. *PLoS ONE* (2011) 6(7): e22090. doi:10.1371/journal.pone.0022090
  203. Jun-Hua Liang, Jian-Ping Jia. Dysfunctional autophagy in Alzheimer's disease: pathogenic roles and therapeutic implications. *Neurosci Bull* April 1, 2014, 30(2): 308–316
  204. Coffey EE, Beckel JM, Laties AM, Mitchell CH Lysosomal alkalization and dysfunction in human fibroblasts with the Alzheimer's disease-linked presenilin 1 A246E mutation can be reversed with cAMP. *Neuroscience*. 2014 Mar 28;263:111-24
  205. Ameneh Zare-shahabadi, Eliezer Mesliah, Gail V.W. Johnson and Nima Rezaei. Autophagy in Alzheimer disease. *Rev. Neuroscienece* 2015; 26 (4): 385-395

206. Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibanaï K, et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 1995, 15: 1001–1011
207. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005, 1: 112–119.
208. Rami A, Langhagen A, Steiger S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis* 2008, 29: 132–141
209. Sairanen T, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, et al. Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke—a possible target of antiapoptotic treatments. *Brain* 2006; 129:189–199
210. Mei Li, Meiling Sun, Lijuan Cao, Jin-hua Gu, Jianbin Ge, et al. A TIGAR-Regulated Metabolic Pathway Is Critical for Protection of Brain Ischemia. *Journal of Neuroscience* 28 May 2014, 34 (22) 7458-7471
211. JieyuChen, Ding-MeiZhang, XingFeng,JianWang',Yuan-YuanQin , TianZhang et al. TIGAR inhibits ischemia/reperfusion-induced inflammatory response of astrocytes. *Neuropharmacology*. 2018 Mar 15; 131:377-388
212. Emahazion T, Feuk L, Jobs M, et al. SNP association studies in Alzheimer's disease highlight problems for complex disease analysis. *Trends Genet* 2001; 17(7):407-413.
213. Rosenmann H, Meiner Z, Kahana E, et al. An association study of the codon 72 polymorphism in the pro-apoptotic gene p53 and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2003 340(1):29-32.
214. Cristina Rodríguez, Tomás Sobrino, Jesús Agulla, Verónica Bobo-Jiménez, María E Ramos-Araque, Juan J Duarte, José C Gómez-Sánchez, Juan P Bolaños, José Castillo and Ángeles Almeida. Neovascularization and functional recovery after intracerebral hemorrhage is conditioned by the Tp53 Arg72Pro single-nucleotide polymorphism. *Cell Death and Differentiation* (2017) 24, 144–154
215. Maria E. Ramos-Araque, Cristina Rodríguez, Rebeca Vecino, Elisa Cortijo García, Mercedes de Lera Alfonso, Mercedes Sanchez Barba, Laura Colàs-Campàs, Francisco Purroy, Juan F. Arenillas, Angeles Almeida, Maria Delgado-Esteban. The Neuronal Ischemic Tolerance Is Conditioned by the Tp53 Arg72Pro Polymorphism. *Transl Stroke Res*. 2018 Apr 23. doi: 10.1007/s12975-018-0631-1.

216. Barabash A, Marcos A, Ancín I, Vázquez-Alvarez B, de Ugarte C, Gil P, Fernández C, Encinas M, López-Ibor JJ, Cabranes JA. APOE, ACT and CHRNA7 genes in the conversion from amnesic mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* (2009) 30:1254–1264
217. Pozueta A, Vázquez-Higuera JL, Sánchez-Juan P, Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Quintana C, Mateo I, Berciano J, Combarros O. Genetic variation in caspase-1 as predictor of accelerated progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *J Neurol* (2011) 258:1538–1539
218. Xingbin Wang, Oscar L. Lopez, Robert A. Sweet, James .T Becker, Steven T. DeKosky, Mahmud M. Barmada, F. Yesim Demirci, M. Ilyas. Kamboh Genetic determinants of disease progression in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2015 January 1; 43(2): 649–655
219. David Peterson, Caitlin Munger, Jared Crowley, Chris Corcoran, Carlos Cruchaga, Alison M. Goate, Maria C. Norton, Robert C. Green et al. Variants in *PPP3R1* and *MAPT* are associated with more rapid functional decline in Alzheimer's disease: The Cache County Dementia Progression Study *Alzheimers Dement.* 2014 May; 10(3): 366–371.
220. Roemer K. Are the conspicuous interdependences of fecundity, longevity and cognitive abilities in humans caused in part by p53? *Cell Cycle* 2010; 9(17):3438- 3441.  
Matthew E. Peters, M.D., Sarah Schwartz, M.S., Dingfen Han, Ph.D., Peter V. Rabins, M.D., Martin Steinberg, M.D., Joann T. Tschanz, Ph.D., and Constantine G. Lyketsos, M.D., M.H.S. Neuropsychiatric symptoms as predictors of progression to severe Alzheimer's dementia and death: The Cache County Dementia Progression Study. *Am J Psychiatry.* 2015 May 1; 172(5): 460–465
221. Stern Y, Tang MX, Albert MS, Brandt J, Jacobs DM, Bell K, Marder K, Sano M, Devanand D, Albert SM, Bylsma F, Tsai WY. Predicting time to nursing home care and death in individuals with Alzheimer disease. *JAMA.* 1997 Mar 12; 277(10):806–812.
222. Rountree SD, Chan W, Pavlik VN, Darby EJ, Siddiqui S, Doody RS. Persistent treatment with cholinesterase inhibitors and/or memantine slows clinical progression of Alzheimer disease. *Alzheimers Res Ther.* 2009; 1:7
223. Bakchine S, Loft H. Memantine treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled 6-month study. *J Alzheimers Dis.* 2007; 11:471–479

224. Magierski R, Kłoszewska I, Sobów TM. The influence of vascular risk factors on the survival rate of patients with dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease. *Neurol Neurochir Pol.* 2010 Mar-Apr;44(2):139-47

## **CAPÍTULO 8: ANEXOS**

## ANEXO I: FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

El estudio sobre Demencia Vascular y Enfermedad de Alzheimer en el que va a participar consiste en la recogida de una muestra de sangre mediante punción venosa antecubital, para la extracción de DNA y posterior estudio de polimorfismos (variantes genéticas) que condicionan la producción en mayor o menor cantidad de determinadas proteínas que creemos pueden participar en el desarrollo de estas enfermedades. Este análisis genético molecular será llevado a cabo en el Departamento de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y las muestras de sangre serán almacenadas en el Departamento previamente citado, asignándoseles un código.

En este estudio no se precisa la administración de ningún medicamento extra (aparte de los indicados por los médicos habituales de cada paciente), ni existen riesgos de efectos secundarios, excepto los propios de una punción venosa antecubital.

D/D<sup>a</sup> ....., con DNI.....

O en caso de tener asignado representante legal:

D./D<sup>a</sup>....., con D.N.I....., como representante legal de D./D<sup>a</sup>....., con D.N.I.....

Informado/a del alcance de la prueba, doy mi conformidad para su realización, otorgando permiso para la utilización científica de los datos, respetando la confidencialidad y conservado el derecho de interrumpir mi colaboración en el momento que lo deseara.

En ..... a ..... de ..... de .....

Firma del investigador:

Firma del paciente (o del representante legal):

Fdo: .....

Fdo: .....

## ANEXO II: PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS

FECHA INGRESO ESTUDIO: __/__/__ GRUPO DEMENCIA/GRUPO CONTROL	
PROCEDENCIA:	
1. Hospital Clínico (Salamanca)	4. CRE Alzheimer (Salamanca)
2. Hospital Virgen Vega (Salamanca)	5. AFA (Ávila)
3. Hospital Ntra. Señora de Sonsoles (Ávila)	6. Residencia Decanos (Ávila)

<b>1. DATOS DE IDENTIFICACIÓN</b>	
Nº de referencia laboratorio: .....	
Fecha de nacimiento: .../.../.....	Lugar de nacimiento: .....
Sexo: Mujer <input type="checkbox"/> Hombre <input type="checkbox"/>	

<b>2. DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS</b>	
Escolaridad:	
<input type="checkbox"/> < 8 años de edad	<input type="checkbox"/> Certificado de estudios primarios
<input type="checkbox"/> Estudios terminados a los 8-13 años	<input type="checkbox"/> Educación secundaria

<b>3. ANTECEDENTES PERSONALES</b>	
<b>FACTORES DE RIESGO VASCULAR:</b>	
a) Hipertensión arterial: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Años de evolución:.....
b) Diabetes Mellitus: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Años de evolución:.....
c) Dislipemia: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Años de evolución:.....
<b>HÁBITOS Y ESTILO DE VIDA:</b>	
a) Fumador: <input type="checkbox"/> actual; cigarrillos/día: ..... ; años de fumador: .....	
<input type="checkbox"/> nunca	
<input type="checkbox"/> En el pasado; años sin fumar:.....	
b) Alcohol: <input type="checkbox"/> A diario <input type="checkbox"/> semanal <input type="checkbox"/> nunca <input type="checkbox"/> en el pasado	
(Cantidad aproximada y otro tipo de bebidas: .....) )	
c) Consumo de otro tipo de sustancias: <input type="checkbox"/> Si; Tipo y frecuencia..... <input type="checkbox"/> No	
<b>Otros antecedentes personales:</b>	
• Traumatismo craneoencefálico: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No; Pérdida de conocimiento: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	
• Intervenciones quirúrgicas:	
• Agentes alérgenos conocidos: <input type="checkbox"/> Si; tipo de alérgeno:..... <input type="checkbox"/> No	
• Otras enfermedades <sup>(2)</sup> : .....	
<sup>(2)</sup> En caso de tumores o enfermedades inflamatorias crónicas, el sujeto es excluido del estudio	

COMORBILIDAD (en el grupo de demencia)
<b>Historia cerebrovascular:</b> <input type="checkbox"/> AIT <input type="checkbox"/> Ictus hemorrágico <input type="checkbox"/> Ictus isquémico  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Localización (hemisferio):  <input type="checkbox"/> Derecho      <input type="checkbox"/> Izquierdo      <input type="checkbox"/> Ambos</li> <li>• Etiología del ictus (TOAST ®)<sup>(3)</sup>  <input type="checkbox"/> Aterotrombótico    <input type="checkbox"/> Indeterminado  <input type="checkbox"/> Cardioembólico    <input type="checkbox"/> Otros  <input type="checkbox"/> Lacunar  ECG: (Descripción).....  Si tiene Eco-cardio: (detallar).....  Si tiene Eco doppler TSA: (detallar).....</li> </ul>

4. DATOS RELEVANTES EN LA EXPLORACIÓN FÍSICA
Signos vitales: TAS..... TAD:..... FC:.....
Oído: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal
Vista: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal
NIHSS ..... puntos
Otros datos relevantes de la exploración física:.....

5. HISTORIA DE LA DEMENCIA
<b>Tipo de Demencia:</b> <input type="checkbox"/> Demencia vascular <input type="checkbox"/> Cortical: <input type="checkbox"/> ACA <input type="checkbox"/> Área de asociación <input type="checkbox"/> ACP <input type="checkbox"/> Territorio carotídeo frontera <input type="checkbox"/> Subcortical: - Leucoaraiosis: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No - Infartos lacunares: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No - Infartos talámicos: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Enfermedad de Alzheimer
<b>Tiempo de evolución</b> (años):..... <b>Edad de inicio</b> :.....
<b>ESTADIO CDR:</b> <input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Grave
<b>MMSE (Folstein)</b> : ...../30 puntos
<b>Otros test neuropsicológicos</b> (p.ej. test del reloj):.....
<b>Inventario Neuropsiquiátrico (NPI):</b> ...../144 puntos
Delirio: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No      Apatía: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Alucinaciones: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No      Desinhibición: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Agitación: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No      Labilidad: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Depresión: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No      Conducta sin fin: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Ansiedad: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No      Trastorno del sueño: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Euforia: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No      Trastorno del apetito: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
<b>MEDICACIÓN ANTERIOR Y ACTUAL PARA LA DEMENCIA:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurolépticos: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</li> <li>• Antidepresivos: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</li> <li>• Ansiolíticos: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</li> </ul>

- Hipnóticos: Si No
- Antiepilépticos: Si No
- Fármacos modificadores de la enfermedad: Si No
- Inhibidores de acetilcolinesterasa:  Memantina

<b>6. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS:</b>
<p><b>Determinaciones en sangre:</b></p> <input type="checkbox"/> Hemograma: ..... <input type="checkbox"/> Electrolitos (incluido Calcio):..... <input type="checkbox"/> Creatinina:..... Urea:..... Glucemia basal:..... <input type="checkbox"/> Colesterol total:..... HDL-col:..... LDL-col:..... Triglicéridos:..... <input type="checkbox"/> Pruebas de función hepática:..... <input type="checkbox"/> T4 libre:..... TSH:..... Vitamina B12:..... Ácido fólico:..... <input type="checkbox"/> Coagulación (incluido fibrinógeno):.....
<p><b>Estudios de neuroimagen:</b></p> <input type="checkbox"/> TAC cerebral y/o RMN cerebral ( <i>descripción</i> )..... <input type="checkbox"/> SPECT cerebral: ( <i>detallar</i> ).....

<b>7. ANÁLISIS GENÉTICO</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Polimorfismo A399G de XRCC1 (rs1799782)</li> <li>b. Polimorfismo L751G de ERCC2 (rs13181)</li> <li>c. Polimorfismo T241M de XRCC3 (rs861539)</li> <li>d. Polimorfismo A72P de Tp53 (rs1042522)</li> <li>e. Polimorfismo Q1383E de gen ATG2B (rs3759601)</li> <li>f. Polimorfismo T300A de gen ATG16L1 (rs2241880)</li> <li>g. Polimorfismo T212M de gen ATG10 (rs1864483)</li> <li>h. Polimorfismo intrónico de gen ATG5 (rs2245214)</li> <li>e. Polimorfismo M129V de gen PRPN (rs 1799990)</li> </ul>

**ANEXO III: APROXIMACION AL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DEL ICTUS ISQUÉMICO SEGÚN LOS CRITERIOS DEL TRIAL OF ORG 10172 IN ACUTE STROKE TREATMENT (TOAST®) (130)**

**Antes deberá realizarse anamnesis y exploración física, estudio de neuroimagen, Doppler de troncos supraaórticos y transcraneal, estudios de hemostasia, ecocardiograma y angiografía cerebral si fuera preciso.**

**1. Infarto aterotrombótico. Aterosclerosis de arteria grande**

Infarto generalmente de tamaño medio o grande, de topografía cortical o subcortical y localización carotidea o vertebrobasilar, en el que se cumple alguno de los dos criterios siguientes:

A. Aterosclerosis con estenosis: estenosis  $\geq$  50% del diámetro luminal u oclusión de la arteria extracraneal correspondiente o de la arteria intracraneal de gran calibre (cerebral media, cerebral posterior o tronco basilar), en ausencia de otra etiología.

B. Aterosclerosis sin estenosis : presencia de placas o de estenosis  $<$ 50% en la arteria cerebral media, cerebral posterior o basilar, en ausencia de otra etiología y en presencia de más de dos de los siguientes factores de riesgo vascular cerebral: edad  $>$ 50 años, hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo o hipercolesterolemia.

**2. Infarto cardioembólico**

Infarto generalmente de tamaño medio o grande, de topografía habitualmente cortical, en el que se evidencia, en ausencia de otra etiología, alguna de las siguientes cardiopatías embolígenas: un trombo o tumor intracardiaco, estenosis mitral reumática, prótesis aortica o mitral, endocarditis, fibrilación auricular, enfermedad del nodo sinusal, aneurisma ventricular izquierdo o acinesia después de un infarto agudo de miocardio, infarto agudo de miocardio (menos de tres meses) o hipocinesia cardiaca global o discinesia.

**3. Enfermedad oclusiva de pequeño vaso arterial. Infarto lacunar**

Infarto de pequeño tamaño ( $<$ 1,5 cm de diámetro) en el territorio de una arteria perforante cerebral, que suele ocasionar clínicamente un síndrome lacunar (hemiparesia motora pura, síndrome sensitivo puro, síndrome sensitivo motriz, hemiparesia atáxica y disartria mano torpe) en un paciente con antecedente personal de hipertensión arterial u otros factores de riesgo vascular cerebral, en ausencia de otra etiología.

**4. Infarto cerebral de causa rara**

Infarto de tamaño pequeño, mediano o grande, de localización cortical o subcortical, en el territorio carotideo o vertebrobasilar en un paciente en el que se ha descartado el origen aterotrombótico, cardioembólico o lacunar. Se suele producir por trastornos sistémicos (conectivopatía, infección, neoplasia, síndrome mieloproliferativo, alteraciones metabólicas, de la coagulación, etc.) o por otras enfermedades, como disección arterial, displasia fibromuscular, aneurisma sacular, malformación arteriovenosa, trombosis venosa cerebral, angeítis, migraña, etc.

**5. Infarto cerebral de origen indeterminado**

Infarto de tamaño medio o grande, de localización cortical o subcortical, en el territorio carotideo o vertebrobasilar, en el cual, tras un exhaustivo estudio diagnóstico, han sido descartados los subtipos aterotrombótico, cardioembólico, lacunar y de causa rara, o bien coexistía más de una posible etiología. Dentro de esta etiología indeterminada se podrían plantear unas subdivisiones que aclararían mejor este apartado; estudio incompleto, más de una etiología y desconocida.

**ANEXO IV: ESCALA CLÍNICA DEMENTIA RATING DE HUGHES (131,132)**

<b>ÁREA</b>	<b>SANOS (CDR 0)</b>	<b>CUESTIONABLE (CDR 0,5)</b>	<b>LEVE (CDR 1)</b>	<b>MODERADA (CDR 2)</b>	<b>GRAVE (CDR 3)</b>
<b>MEMORIA</b>	Sin pérdida de memoria. Olvidos de poca importancia	Olvidos consistentes leves: recuerdo parcial de acontecimientos. Olvidos "benignos"	Pérdida de memoria moderada, más marcada para acontecimientos recientes: el defecto interfiere con actividades diarias	Grave pérdida de memoria: retención exclusiva de material muy importante: pérdida rápida de material nuevo	Grave pérdida de memoria, sólo quedan fragmentos
<b>ORIENTACIÓN</b>	Completamente orientado	Completamente orientado	Algunas dificultades con relaciones temporales: orientados por lugar y persona durante la prueba pero puede haber desorientación geográfica	Habitualmente desorientación temporal, a menudo de lugar	Orientación sólo respecto a personas
<b>JUICIO Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS</b>	Resuelve bien problemas cotidianos: juicio bueno en relación al rendimientos pasado	Sólo deterioro dudoso en la resolución de problemas. Similitudes/diferencias	Dificultad moderada para manejar problemas complejos: juicio social suele mantenerse	Manejo de problemas gravemente deteriorado. Similitudes/diferencias: juicio social suele estar deteriorado	Incapaz de intentar juicio o resolver problemas
<b>VIDA SOCIAL</b>	Función independiente en nivel habitual de trabajo, compras, negocios y asuntos financieros, grupos sociales y voluntarios	Deterioro dudoso o leve, si es que existe, en estas actividades	Incapaz de funcionar independientemente en estas actividades aunque todavía puede realizar algunas: puede aparecer normal en contacto casual	Ninguna pretensión de funcionamiento independiente fuera del hogar	Ninguna pretensión de función independiente fuera del hogar
<b>EL HOGAR Y LAS AFICIONES</b>	Vida doméstica, aficiones, intereses intelectuales se mantienen bien	Vida doméstica, aficiones, intereses intelectuales se mantienen bien, sólo ligeramente deteriorados	Leve pero definitivo deterioro de función doméstica: se abandonan las tareas más difíciles, se abandonan aficiones e intereses más complejos	Sólo se conservan las tareas 240 más sencillas: intereses muy limitados. Mantenimiento pobre	Ninguna función doméstica significativa fuera de la habitación propia
<b>CUIDADO PERSONAL</b>	Totalmente capaz de cuidar de si mismo	Totalmente capaz de cuidar de si mismo	Necesita estimulación ocasional	Necesita asistencia para vestirse, lavarse y cuidar sus efectos personales	Requiere mucha ayuda para el cuidado personal: a menudo incontinente

## **ANEXO V: MINI MENTAL STATE EXAMINATION DE FOLSTEIN (127)**

### **ORIENTACION TEMPORAL**

¿En qué año estamos? 0-1

¿En qué estación? 0-1

¿En qué día (fecha)? 0-1

¿En qué mes? 0-1

¿En qué día de la semana? 0-1

### **ORIENTACION ESPACIAL**

¿En qué hospital (o lugar) estamos? 0-1

¿En qué piso (o planta, sala, servicio)? 0-1

¿En qué pueblo (ciudad)? 0-1

¿En qué provincia estamos? 0-1

¿En qué país (o nación, autonomía)? 0-1

### **FIJACION RECUERDO INMEDIATO**

Nombre tres palabras Peseta-Caballo-Manzana (o Balón- Bandera-Árbol) a razón de 1 por segundo. Luego se pide al paciente que las repita. Esta primera repetición otorga la puntuación. Otorgue 1 punto por cada palabra correcta, pero continúe diciéndolas hasta que el sujeto repita las 3, hasta un máximo de 6 veces. Peseta 0-1 Caballo 0-1 Manzana 0-1 (Balón 0-1 Bandera 0-1 Árbol 0-1) Nº de repeticiones necesarias:

### **ATENCION-CALCULO**

Si tiene 30 pesetas y me va dando de tres en tres, ¿cuantas le van quedando? Detenga la prueba tras 5 sustracciones. Si el sujeto no puede realizar esta prueba, pídale que deletree la palabra MUNDO al revés.

30 0-1 27 0-1 24 0-1 21 0-1 18 0-1

(O 0-1 D 0-1 N 0-1 U 0-1 M 0-1)

### **RECUERDO DIFERIDO**

Preguntar por las tres palabras mencionadas anteriormente. Peseta 0-1 Caballo 0-1 Manzana 0-1 (Balón 0-1 Bandera 0-1 Árbol 0-1)

### **LENGUAJE Y CONSTRUCCION**

#### **DENOMINACION.**

Mostrarle un lápiz o un bolígrafo y preguntar .que es esto? Hacer lo mismo con un reloj de pulsera. Lápiz 0-1 Reloj 0-1

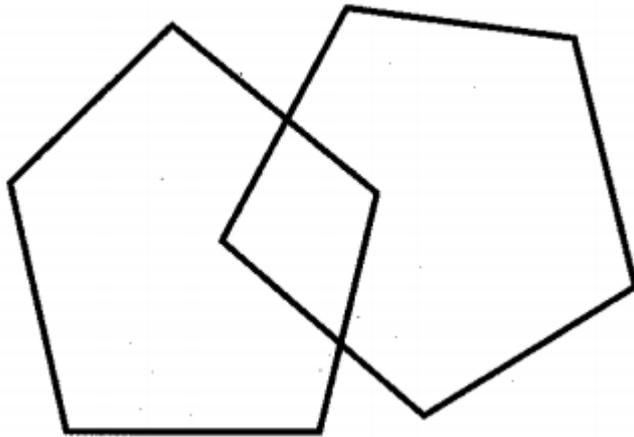
**REPETICION.** Pedirle que repita la frase: "ni si, ni no, ni pero" (o "En un trigal habia 5 perros") 0-1

**ORDENES.** Pedirle que siga la orden: "coja un papel con la mano derecha, dóblelo por la mitad, y póngalo en el suelo". Coja con mano d. 0-1 dobla por mitad 0-1 pone en suelo 0-1

**LECTURA.** Escriba legiblemente en un papel "Cierre los ojos". Pídale que lo lea y haga lo que dice la frase 0-1

**ESCRITURA.** Que escriba una frase (con sujeto y predicado) 0-1

**DIBUJO.** Dibuje 2 pentágonos intersecados y pida al sujeto que los copie tal cual. Para otorgar un punto deben estar presentes los 10 ángulos y la intersección 0-1



## ANEXO VI: INVENTARIO NEUROPSIQUIÁTRICO DE CUMMINGS (128)

Síntoma	No valorable	Frecuencia	Gravedad	Total (Frecuencia X Gravedad)
Delirios		0 1 2 3 4	1 2 3	
Alucinaciones		0 1 2 3 4	1 2 3	
Agitación/agresividad		0 1 2 3 4	1 2 3	
Depresión/disforia		0 1 2 3 4	1 2 3	
Ansiedad		0 1 2 3 4	1 2 3	
Júbilo/euforia		0 1 2 3 4	1 2 3	
Apatía		0 1 2 3 4	1 2 3	
Desinhibición		0 1 2 3 4	1 2 3	
Irritabilidad/labilidad		0 1 2 3 4	1 2 3	
Comportamiento motor aberrante		0 1 2 3 4	1 2 3	
Trastornos del sueño		0 1 2 3 4	1 2 3	
Trastorno del apetito/conducta alimentaria		0 1 2 3 4	1 2 3	

La **frecuencia** se puntúa como:

0. Ausente
1. Ocasionalmente (menos de una vez por semana)
2. A menudo (alrededor de una vez por semana)
3. Frecuentemente (varias veces por semana, pero no a diario)
4. Muy frecuentemente (a diario o continuamente)

La **gravedad** se puntúa como:

1. Leve (produce poca angustia al paciente)
2. Moderada (más molesto para el paciente, pero el cuidador aún puede controlarlo)
3. Grave (muy molesto para el paciente y difícil de controlar)

## ANEXO VII: DISTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES POLIMORFISMOS POR EDAD

**Tabla 1:** Distribución del gen *XRCC1* en Enfermedad de Alzheimer y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	EA N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 99</b>			
Arg/Arg	37 (35,6%)	45 (45,5%)	1		
Arg/Gln	55 (52,9%)	41 (41,4%)	0,54	(0,29-1,02)	0,059
Gln/Gln	12 (11,5%)	13 (13,1%)	1,05	(0,41-2,69)	0,917
Dominante			0,63	(0,35-1,15)	0,130
Recesivo			0,69	(0,29-1,66)	0,408
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 101</b>			
Arg/Arg	46 (47,4%)	42 (41,6%)	1		
Arg/Gln	42 (43,3%)	43 (42,6%)	1,05	(0,54-2,02)	0,891
Gln/Gln	9 (9,3%)	16 (15,8%)	1,59	(0,58-4,34)	0,367
Dominante			1,15	(0,62-2,13)	0,665
Recesivo			0,64	(0,25-1,66)	0,361

**Tabla 2:** Distribución del gen *ERCC2* en Enfermedad de Alzheimer y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	EA N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 99</b>			
Lys/Lys	45 (43,3%)	50 (50,5%)	1		
Lys/Gln	43 (41,3%)	36 (36,4%)	0,71	(0,38-1,35)	0,302
Gln/Gln	16 (15,4%)	13 (13,1%)	0,80	(0,33-1,91)	0,610
Dominante			0,74	(0,41-1,33)	0,311
Recesivo			1,08	(0,47-2,49)	0,848
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 101</b>			
Lys/Lys	47 (48,5%)	40 (39,6%)	1		
Lys/Gln	37 (38,1%)	52 (51,5%)	1,59	(0,82-3,05)	0,168
Gln/Gln	13 (13,4%)	9 (8,9%)	0,51	(0,17-1,55)	0,235
Dominante			1,29	(0,69-2,39)	0,426
Recesivo			2,47	(0,86-7,13)	0,094

**Tabla 3:** Distribución del gen *XRCC3* en Enfermedad de Alzheimer y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	EA N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 99</b>			
Thr/Thr	66 (63,5%)	54 (54,5%)	1		
Thr/Met	35 (33,7%)	39 (39,4%)	1,54	(0,83-2,86)	0,170
Met/Met	3 (2,9%)	6 (6,1%)	2,35	(0,52-10,68)	0,270
Dominante			1,61	(0,89-2,93)	0,116
Recesivo			0,50	(0,11-2,25)	0,369
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 101</b>			
Thr/Thr	59 (60,8%)	63 (62,4%)	1		
Thr/Met	32 (33%)	29 (28,7%)	0,88	(0,45-1,72)	0,704
Met/Met	6 (6,2%)	9 (8,9%)	1,00	(0,29-3,43)	0,999
Dominante			0,90	(0,48-1,69)	0,748
Recesivo			0,96	(0,28-3,22)	0,945

**Tabla 4:** Distribución del gen *XRCC1* en Demencia Vascular y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	DV N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 110</b>			
Arg/Arg	37 (35,6%)	41 (37,3%)	1		
Arg/Gln	55 (52,9%)	53 (48,2%)	0,91	(0,50-1,66)	0,755
Gln/Gln	12 (11,5%)	16 (14,5%)	1,30	(0,53-3,18)	0,561
Dominante			0,98	(0,55-1,74)	0,941
Recesivo			0,73	(0,32-1,65)	0,444
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 90</b>			
Arg/Arg	46 (47,4%)	23 (25,6%)	1		
Arg/Gln	42 (43,3%)	54 (60,0%)	2,63	(1,36-5,09)	<b>0,004</b>
Gln/Gln	9 (9,3%)	13 (14,4%)	2,88	(1,07-7,75)	<b>0,037</b>
Dominante			2,68	(1,42-5,05)	<b>0,002</b>
Recesivo			0,61	(0,25-1,52)	0,291

Tabla 5: Distribución del gen <i>ERCC2</i> en Demencia Vascolar y controles según edad					
Modelo	Controles N (%)	DV N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 110</b>			
Lys/Lys	45 (43,3%)	48 (43,6%)	1		
Lys/Gln	43 (41,3%)	46 (41,8%)	0,98	(0,54-1,797)	0,953
Gln/Gln	16 (15,4%)	16 (14,5%)	0,79	(0,34-1,84)	0,587
Dominante			0,93	(0,53-1,62)	0,796
Recesivo			1,25	(0,57-2,77)	0,578
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 90</b>			
Lys/Lys	47 (48,5%)	36 (40,0%)	1		
Lys/Gln	37 (38,1%)	40 (44,4%)	1,39	(0,74-2,60)	0,301
Gln/Gln	13 (13,4%)	14 (15,6%)	1,34	(0,55-3,22)	0,520
Dominante			1,37	(0,77-2,47)	0,285
Recesivo			0,88	(0,39-2,01)	0,763

Tabla 6: Distribución del gen <i>XRCC3</i> en Demencia Vascolar y controles según edad					
Modelo	Controles N (%)	DV N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 110</b>			
Thr/Thr	66 (63,5%)	49 (44,5%)	1		
Thr/Met	35 (33,7%)	36 (32,7%)	1,16	(0,62-2,17)	0,641
Met/Met	3 (2,9%)	25 (22,7%)	11,19	(3,16-39,59)	<b>0,0001</b>
Dominante			1,95	(1,11-3,43)	<b>0,020</b>
Recesivo			0,09	(0,03-0,33)	<b>0,0001</b>
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 90</b>			
CC	59 (60,8%)	38 (42,2%)	1		
CT	32 (33%)	38 (42,2%)	1,86	(0,99-3,48)	0,051
TT	6 (6,2%)	14 (15,6%)	3,64	(1,28-10,32)	<b>0,015</b>
Dominante			2,15	(1,19-3,86)	<b>0,011</b>
Recesivo			0,36	(0,13-0,98)	<b>0,045</b>

**Tabla 7:** Distribución del gen *PrNP* en Enfermedad de Alzheimer y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	EA N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 99</b>			
Met/Met	50 (48,1%)	43 (43,4%)	1		
Met/Val	43 (41,3%)	50 (50,5%)	1,31	(0,71-2,41)	0,379
Val/Val	11 (10,6%)	6 (6,1%)	0,50	(0,15-1,65)	0,257
Dominante			1,16	(0,64-2,08)	0,626
Recesivo			2,30	(0,73-7,29)	0,156
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 101</b>			
Met/Met	48 (49,5%)	39 (38,6%)	1		
Met/Val	34 (35,1%)	46 (45,5%)	1,70	(0,87-3,33)	0,121
Val/Val	15 (15,5%)	16 (15,8%)	1,24	(0,50-3,06)	0,645
Dominante			1,56	(0,84-2,90)	0,163
Recesivo			1,05	(0,45-2,43)	0,914

**Tabla 8:** Distribución del gen *ATG16L1* en Enfermedad de Alzheimer y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	EA N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 99</b>			
Thr/Thr	23 (22,1%)	19 (19,2%)	1		
Thr/Ala	45 (43,3%)	56 (56,6%)	1,70	(0,77-3,75)	0,186
Ala/Ala	36 (34,6%)	24 (24,4%)	1,03	(0,43-2,46)	0,944
Dominante			1,43	(0,68-3,02)	0,349
Recesivo			1,42	(0,74-2,73)	0,296
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 101</b>			
Thr/Thr	17 (17,5%)	24 (23,8%)	1		
Thr/Ala	54 (55,7%)	46 (45,5%)	0,62	(0,28-1,38)	0,237
Ala/Ala	26 (26,8%)	31 (30,7%)	0,84	(0,34-2,06)	0,706
Dominante			0,69	(0,32-1,47)	0,333
Recesivo			0,84	(0,42-1,65)	0,604

**Tabla 9:** Distribución del gen *ATG5* en Enfermedad de Alzheimer y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	EA N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 99</b>			
CC	41 (39,4%)	40 (40,4%)	1		
CG	51 (49,0%)	44 (44,4%)	0,70	(0,36-1,36)	0,289
GG	12 (11,5%)	15 (15,2%)	1,53	(0,61-3,84)	0,365
Dominante			0,86	(0,46-1,58)	0,623
Recesivo			0,55	(0,23-1,29)	0,170
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 101</b>			
CC	41 (42,3%)	51 (50,5%)	1		
CG	45 (46,4%)	38 (37,6%)	0,82	(0,43-1,57)	0,549
GG	11 (11,3%)	12 (11,9%)	0,70	(0,25-1,95)	0,495
Dominante			0,79	(0,43-1,46)	0,453
Recesivo			1,30	(0,49-3,46)	0,599

**Tabla 10:** Distribución del gen *ATG10* en Enfermedad de Alzheimer (EA) y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	EA N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 99</b>			
Thr/Thr	27 (26,0%)	23 (23,2%)	1		
Thr/Met	51 (49,0%)	50 (50,5%)	1,07	(0,52-2,20)	0,860
Met/Met	26 (25,0%)	26 (26,3%)	0,97	(0,42-2,25)	0,947
Dominante			1,04	(0,52-2,05)	0,916
Recesivo			1,08	(0,54-2,13)	0,835
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 101</b>			
Thr/Thr	31 (32,0%)	24 (23,8%)	1		
Thr/Met	45 (46,4%)	58 (57,4%)	1,35	(0,66-2,75)	0,413
Met/Met	21 (21,6%)	19 (18,8%)	0,93	(0,38-2,26)	0,868
Dominante			1,21	(0,62-2,38)	0,579
Recesivo			1,31	(0,61-2,83)	0,489

**Tabla 11:** Distribución del gen *ATG2B* en Enfermedad de Alzheimer y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	EA N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 99</b>			
Gln/Gln	13 (12,5%)	9 (9,1%)	1		
Gln/Glu	42 (40,4%)	44 (44,4%)	1,80	(0,64-5,08)	0,268
Glu/Glu	49 (47,1%)	46 (46,5%)	1,56	(0,56-4,35)	0,400
Dominante			1,67	(0,63-4,48)	0,304
Recesivo			1,03	(0,57-1,87)	0,924
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 101</b>			
Gln/Gln	18 (18,6%)	11 (10,9%)	1		
Gln/Glu	41 (42,3%)	39 (38,6%)	1,35	(0,66-2,75)	0,413
Glu/Glu	38 (39,2%)	51 (50,5%)	0,93	(0,38-2,26)	0,868
Dominante			1,42	(0,60-3,39)	0,424
Recesivo			0,65	(0,35-1,21)	0,175

**Tabla 12:** Distribución del gen *ATG16L1* en Demencia Vascular y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	DV N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 110</b>			
Thr/Thr	23 (22,1%)	19 (17,3%)	1		
Thr/Ala	45 (43,3%)	53(48,2%)	1,32	(0,62-2,77)	0,470
Ala/Ala	36 (34,6%)	38 (34,5%)	1,20	(0,55-2,61)	0,652
Dominante			1,26	(0,63-2,53)	0,510
Recesivo			1,01	(0,57-1,81)	0,963
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 90</b>			
Thr/Thr	17 (17,5%)	17 (18,9%)	1		
Thr/Ala	54 (55,7%)	48 (53,3%)	0,93	(0,42-2,03)	0,847
Ala/Ala	26 (26,8%)	25 (27,8%)	1,02	(0,42-2,47)	0,968
Dominante			0,95	(0,45-2,03)	0,904
Recesivo			0,92	(0,48-1,77)	0,813

**Tabla 13:** Distribución del gen *ATG5* en Demencia Vascular y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	DV N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 110</b>			
CC	41 (39,4%)	45 (40,9%)	1		
CG	51 (49,0%)	50 (45,5%)	0,87	(0,48-1,58)	0,654
GG	12 (11,5%)	15 (13,6%)	1,20	(0,49-2,93)	0,688
Dominante			0,93	(0,53-1,64)	0,813
Recesivo			0,77	(0,34-1,78)	0,547
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 90</b>			
CC	41 (42,3%)	41 (45,6%)	1		
CG	45 (46,4%)	40 (44,4%)	0,89	(0,48-1,63)	0,696
GG	11 (11,3%)	9 (10,0%)	0,82	(0,31-2,18)	0,687
Dominante			0,87	(0,49-1,56)	0,644
Recesivo			1,15	(0,45-2,93)	0,768

**Tabla 14:** Distribución del *ATG10* en Demencia Vascular y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	DV N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 110</b>			
Thr/Thr	27 (26,0%)	25 (22,7%)	1,26	(0,63-2,50)	0,510
Thr/Met	51 (49,0%)	57 (51,8%)	1,24	(0,56-2,74)	0,593
Met/Met	26 (25,0%)	28 (25,5%)	1,25	(0,66-2,40)	0,495
Dominante			1,26	(0,63-2,50)	0,510
Recesivo			0,94	(0,50-1,79)	0,857
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 90</b>			
Thr/Thr	31 (32,0%)	22 (24,4%)	1		
Thr/Met	45 (46,4%)	46 (51,1%)	1,38	(0,69-2,79)	0,366
Met/Met	21 (21,6%)	22 (24,4%)	1,45	(0,64-3,28)	0,369
Dominante			1,41	(0,73-2,71)	0,310
Recesivo			0,85	(0,43-1,68)	0,631

**Tabla 15:** Distribución del *ATG2B* en Demencia Vascolar y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	DV N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N= 104</b>	<b>N = 110</b>			
Gln/Gln	13 (12,5%)	18 (16,4%)	1		
Gln/Glu	42 (40,4%)	44 (40,0%)	0,71	(0,30-1,68)	0,441
Glu/Glu	49 (47,1%)	48 (43,6%)	0,66	(0,28-1,53)	0,326
Dominante			0,68	(0,31-1,51)	0,346
Recesivo			1,19	(0,68-2,08)	0,540
<b>&gt;80 años</b>	<b>N= 97</b>	<b>N= 90</b>			
Gln/Gln	18 (18,6%)	8 (8,9%)	1		
Gln/Glu	41 (42,3%)	34 (37,8%)	1,88	(0,72-4,86)	0,195
Glu/Glu	38 (39,2%)	48 (53,3%)	2,83	(1,11-7,23)	<b>0,029</b>
Dominante			2,34	(0,96-5,70)	0,061
Recesivo			0,57	(0,32-1,02)	0,057

**Tabla 16:** Distribución del gen *TP53* en Enfermedad de Alzheimer y controles según edad

Modelo	Controles N (%)	EA N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	<b>N=109</b>	<b>N=109</b>			
Arg/Arg	58 (53,2)	72 (66,1)	1,00		
Arg/Pro	42 (38,5)	31 (28,4)	0,54	(0,29-1,01)	0,056
Pro/Pro	9 (8,3)	6 (5,5)	0,40	(0,12-1,34)	0,139
Dominante			0,52	(0,29-0,93)	<b>0,030*</b>
Recesivo			1,98	(0,61-6,44)	0,252
<b>&gt;80 años</b>	<b>N=105</b>	<b>N=108</b>			
Arg/Arg	59 (56,2)	71 (65,7)	1,00		
Arg/Pro	38 (36,2)	34 (31,5)	0,73	(0,39-1,39)	0,348
Pro/Pro	8 (7,6)	3 (2,8)	0,26	(0,06-1,17)	0,080
Dominante			0,64	(0,35-1,19)	0,164
Recesivo			3,38	(0,77-14,75)	0,104

**Tabla 17:** Distribución del gen *TP53* en Demencia Vascular y controles según edad

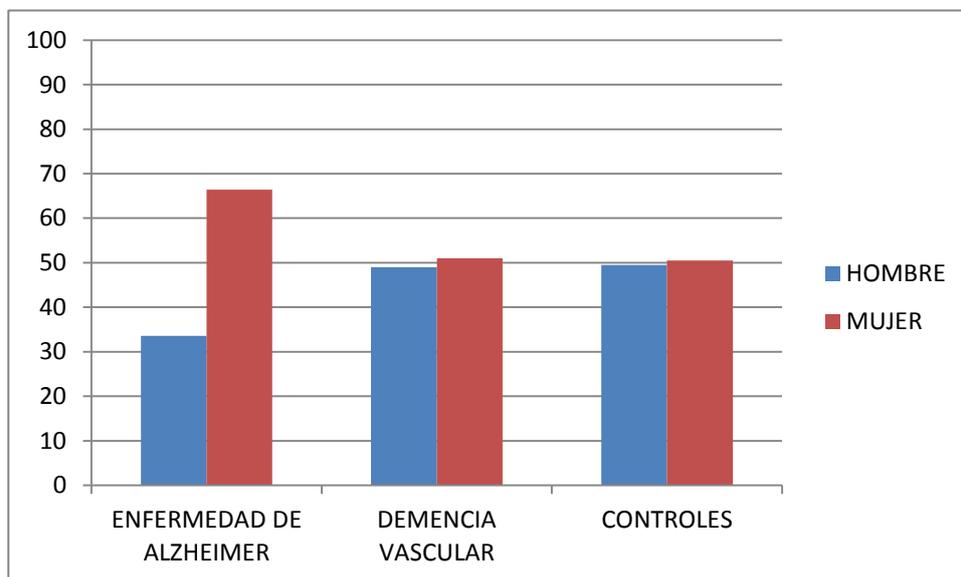
Modelo	Controles N (%)	DV N (%)	OR	IC (95%)	p
<b>≤ 80 años</b>	N=109	N=115			
Arg/Arg	58 (53,2)	70 (60,9)	1,00		
Arg/Pro	42 (38,5)	38 (33,0)	0,67	(0,37-1,22)	0,196
Pro/Pro	9 (8,3)	7 (6,1)	0,47	(0,15-1,47)	0,196
Dominante			0,64	(0,36-1,12)	0,119
Recesivo			1,83	(0,60-5,59)	0,291
<b>&gt;80 años</b>	N=105	N=93			
Arg/Arg	59 (56,2)	63 (67,7)	1,00		
Arg/Pro	38 (36,2)	25 (26,9)	0,64	(0,33-1,24)	0,188
Pro/Pro	8 (7,6)	5 (5,4)	0,46	(0,12-1,70)	0,241
Dominante			0,61	(0,33-1,15)	0,125
Recesivo			1,86	(0,51-6,78)	0,346

**ANEXO VIII: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA MUESTRA DEL POLIMORFISMO Arg75Pro DEL GEN TP53**

**1. SEXO:**

Respecto al sexo la distribución de mujeres y hombres fue similar entre el grupo de Demencia Vascular y los controles (51% de mujeres y 49% de hombres en el caso de la Demencia Vascular y 50,5% de mujeres y 49,5% de hombres entre los controles). Sin embargo, en el grupo de casos de la Enfermedad de Alzheimer se observó un porcentaje más alto de mujeres (66,4%) que de hombres (33,6%), siendo las diferencias entre estos dos grupos estadísticamente significativas ( $p= 0,001$ ). (Figura 1, tabla 1).

<b>Tabla 1: Distribución de los sujetos de la muestra por sexo</b>			
	<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N (%)</b>	<b>DEMENCIA VASCULAR N (%)</b>	<b>CONTROLES N (%)</b>
<b>HOMBRE</b>	73 (33,6%)	102 (49%)	106(49,5%)
<b>MUJER</b>	144 (66,4%)	106 (51%)	108 (50,5%)

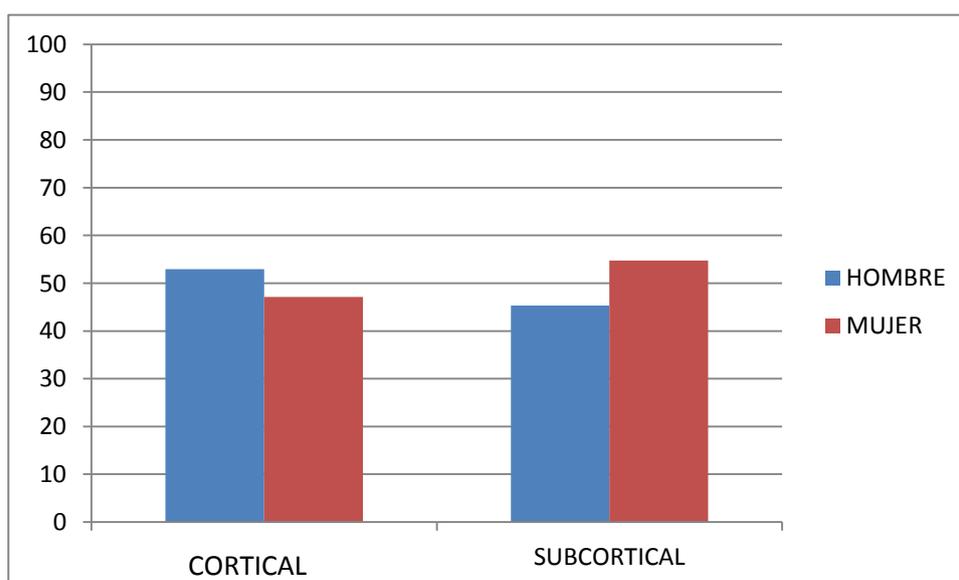


**Figura 1:** Porcentaje de hombres y mujeres en cada grupo de estudio

En cuanto a la diferencia por género dentro del grupo de Demencia Vascular, se observaron porcentajes similares de hombres y mujeres (47,1% de mujeres y 52,9% de hombres para DV cortical, y 54,7% de mujeres y 45,3% de hombres en DV subcortical), sin diferencias

estadísticamente significativas por subtipos en comparación al grupo control. (Tabla 2, Figura 2)

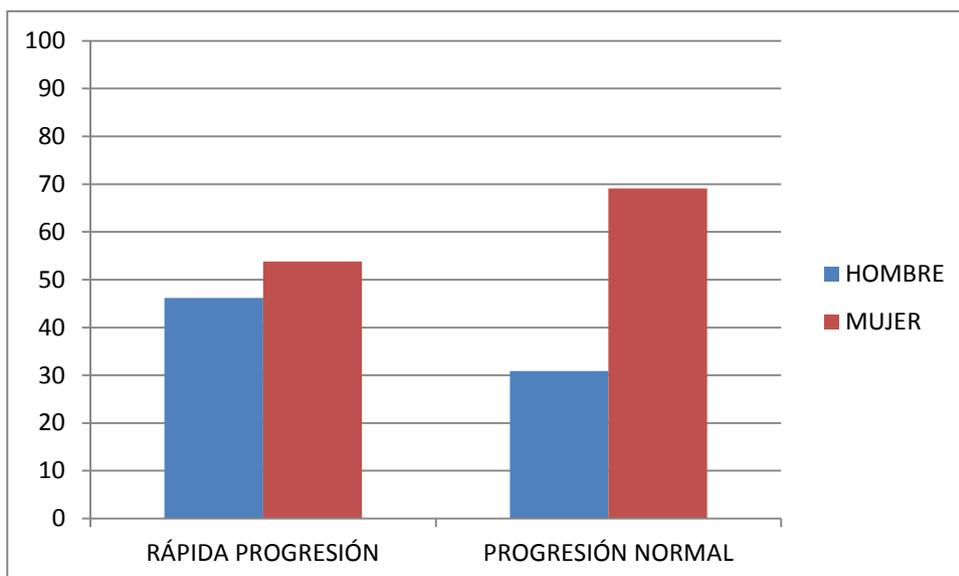
<b>Tabla 2: Distribución por sexos según subtipo de Demencia Vascular</b>		
<b>DEMENCIA VASCULAR</b>	<b>CORTICAL (n=102)</b>	<b>SUBCORTICAL (n=106)</b>
<b>HOMBRE</b>	54 (52,9%)	48 (45,3%)
<b>MUJER</b>	48 (47,1%)	58 (54,7%)



**Figura 2:** Porcentaje de hombres y mujeres según tipo de demencia vascular

En cuanto a la diferencia por género dentro del grupo de Enfermedad de Alzheimer, se observaron porcentajes similares de hombres y mujeres en el grupo de rápida progresión, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas con los controles. Sin embargo, en el grupo de progresión normal se observó un porcentaje mayor de mujeres (69,1%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa frente al grupo control ( $p= 0,0001$ ). (Tabla 3; Figura 3)

<b>Tabla 3: Distribución por sexos según progresión de Enfermedad de Alzheimer</b>			
<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER</b>	<b>DE</b>	<b>RÁPIDA PROGRESIÓN (n=39)</b>	<b>PROGRESIÓN NORMAL (n=178)</b>
<b>HOMBRE</b>		18 (46,2%)	55 (30,9%)
<b>MUJER</b>		21 (53,8%)	123 (69,1%)



**Figura 3:** Porcentaje de hombres y mujeres según la progresión de EA

## 2. EDAD

La edad media de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer fue de 79,7 años (con una desviación estándar (DE) de 6,6 años); la de los pacientes con Demencia Vascul ar de 79,2 años (DE=6,9 años) y la de los controles de 81,1 años (DE=4,9 años). Las diferencias entre los grupos de Enfermedad de Alzheimer y controles fueron estadísticamente significativas ( $p=0,021$ ). También fueron significativas las diferencias entre el grupo de Demencia Vascul ar y controles ( $p=0,002$ ).

Dentro de los pacientes con Demencia Vascul ar la edad media entre en los pacientes con DV cortical es de 78,9 años (DE=7,1), y la de aquellos con DV subcortical de 79,5 años (DE=6,8). Las diferencias entre los grupos de los diferentes subtipos de demencia vascul ar se mantuvieron estadísticamente significativas con respecto al grupo control ( $p=0,002$ ,  $p=0,026$  respectivamente).

Dentro de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, la edad media entre los de rápida progresión fue de 79,9 años (DE=7,4), mientras que la edad media entre los de progresión normal es de 79,7 años (DE=6,5). Las diferencias encontradas entre el grupo de progresión rápida y el grupo control fueron estadísticamente significativas ( $p=0,022$ ).

### 3. NIVEL EDUCATIVO

Para el estudio del nivel educativo se establecieron 4 variables en función de la edad en la que el sujeto hubiera abandonado los estudios. En general, los sujetos del estudio presentaron un nivel educativo medio-bajo. Dentro del grupo control el 44,4% de los pacientes sabían leer y escribir pero no habían completado sus estudios primarios. Este porcentaje es del 57,6% en los pacientes con Demencia Vascular y de 53,4% en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer. (Tabla 4) Las diferencias encontradas entre del grupo de DV y el grupo control fueron estadísticamente significativas ( $p=0,001$ )

**Tabla 4:** Distribución del nivel de instrucción en los sujetos de la muestra

	<b>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N (%)</b>	<b>DEMENCIA VASCULAR N (%)</b>	<b>CONTROLES N (%)</b>
<b>≤ 8 años</b>	40 (18,4%)	50 (24%)	22 (10,3%)
<b>8-13 años</b>	76 (35%)	49 (33,6%)	73 (34,1%)
<b>Estudios elementales</b>	88 (40,6%)	92 (44,2%)	105 (49,1%)
<b>Educación secundaria/Universidad</b>	13 (6%)	17 (8,2%)	14 (6,5%)

Dentro del grupo de Demencia Vascular no habían finalizado los estudios primarios el 48% de los pacientes con DV cortical y el 48,2% de los pacientes con DV subcortical. (Tabla 5) Las diferencias encontradas entre los pacientes con DV cortical y los controles fueron estadísticamente significativas ( $p= 0,043$ ). También fueron estadísticamente significativas las diferencias encontradas en el grupo de DV subcortical frente al grupo control ( $p= 0,001$ ).

**Tabla 5:** Distribución del nivel de instrucción según el subtipo de DV

<b>DEMENCIA VASCULAR</b>	<b>CORTICAL N(%)</b>	<b>SUBCORTICAL N(%)</b>
<b>≤ 8 años</b>	21 (20,6%)	29 (27,4%)
<b>8-13 años</b>	27 (26,5%)	22 (20,8%)
<b>Estudios elementales</b>	44 (43,1%)	48 (45,3%)
<b>Educación secundaria/Universidad</b>	10 (9,8%)	7 (6,6%)

Dentro del grupo de Enfermedad de Alzheimer no habían finalizado los estudios primarios el 61,5% de los pacientes con una rápida evolución y el 51,4 % de los pacientes con una evolución normal. (Tabla 6) Las diferencias encontradas entre el grupo de rápida progresión y el grupo control fueron estadísticamente significativas ( $p= 0,019$ ).

**Tabla 6:** Distribución del nivel de instrucción según la progresión de Enfermedad de Alzheimer

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	RÁPIDA PROGRESIÓN N(%)	PROGRESIÓN NORMAL N(%)
≤ 8 años	10 (25,6%)	30 (16,9%)
8-13 años	14 (35,9%)	62 (34,5%)
Estudios elementales	11 (28,2 %)	77 (43,3%)
Educación secundaria/Universidad	4 (10,3%)	9 (5,1%)

#### 4. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

El análisis de los factores de riesgo cardiovascular de los tres grupos se puede ver resumido en la tabla 7 y en la figura 4.

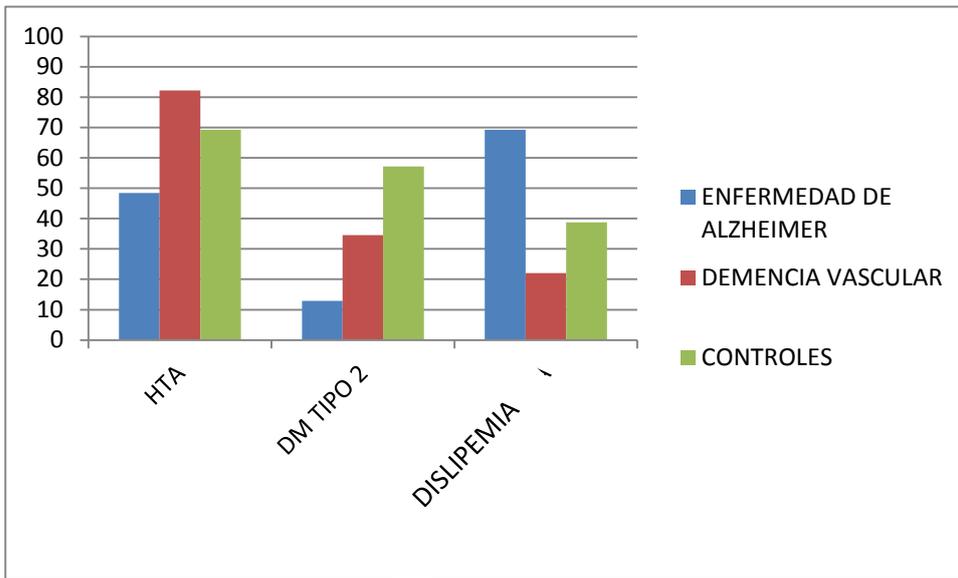
En el grupo control 148 pacientes (69,2%) tenían antecedentes de hipertensión arterial (HTA), 47 pacientes (22%) de diabetes mellitus tipo 2 (DM) y 83 pacientes (38,8%) de dislipemia.

Dentro del grupo de Enfermedad de Alzheimer 96 pacientes (48,4%) tenían antecedente de HTA siendo las diferencias encontradas entre los pacientes con Enfermedad de Alzheimer y los controles estadísticamente significativas ( $p=0.0001$ ). Respecto a la DM, 28 pacientes (12,9%) la padecían, siendo las diferencias encontradas entre el grupo con Enfermedad de Alzheimer y el grupo control estadísticamente significativas ( $p=0,013$ ). En cuanto a la dislipemia 81 pacientes (37,3%) eran dislipémicos, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0,755$ ).

En grupo de Demencia Vascolar 172 pacientes (82,2%) tenían antecedentes de HTA siendo las diferencias encontradas entre aquellos con Demencia Vascolar y los controles estadísticamente significativas ( $p=0,001$ ). Respecto a la DM, 72 pacientes (34,6%) eran diabéticos, siendo las diferencias entre el grupo con DV y el grupo control estadísticamente significativas ( $p=0,004$ ). Por último, en cuanto a la dislipemia, 119 pacientes con Demencia Vascolar (57,2%) presentaban dislipemia, siendo las diferencias entre ambos grupos estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ).

**Tabla 7:** Distribución de los factores de riesgo vascular según la muestra del estudio

		ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N(%)	DEMENCIA VASCULAR N(%)	CONTROLES N(%)
HTA	SI	105 (48,4%)	172 (82,2%)	148 (69,2%)
	NO	112 (51,6%)	36 (17,8%)	66 (30,8%)
DM	SI	28 (12,9%)	72 (34,6%)	47 (22%)
	NO	189 (87,1%)	136 (65,4%)	167 (78%)
DISLIPEMIA	SI	81 (37,3%)	119 (57,2%)	83 (38,8%)
	NO	136 (62,7%)	89 (42,8%)	131 (61,2%)



**Figura 4:** Porcentajes de los diferentes factores de riesgo vascular en la muestra

La presencia de factores de riesgo fue significativamente mayor en el grupo de Demencia Vascular. Existe una mayor frecuencia de antecedentes de HTA, DM y dislipemia en pacientes con Demencia Vascular al compararlos con los pacientes con Enfermedad de Alzheimer y con los controles.

Cuando se compararon los diferentes factores de riesgo según el subtipo de demencia vascular se observó que dentro de grupo de las DV cortical 80 pacientes (78,4%) tenían antecedentes de HTA, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre este subtipo de DV y los controles ( $p=0,087$ ). Respecto a la DM, 38 pacientes (37,3%) de entre aquellos con DV cortical eran diabéticos, siendo las diferencias entre el grupo de DV cortical y el grupo control estadísticamente significativas ( $p=0,004$ ). En cuanto a la dislipemia, 53 pacientes (52%) con DV

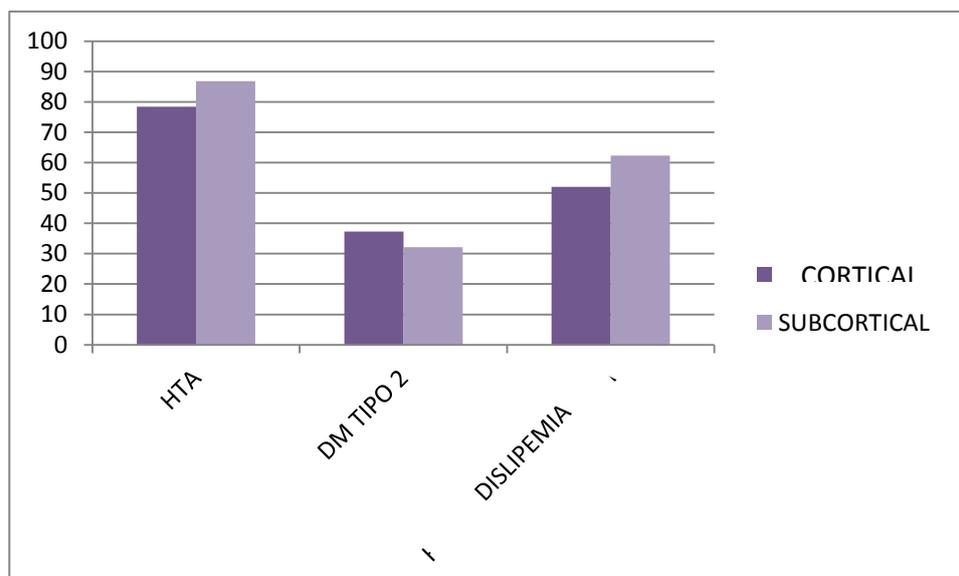
cortical presentaban dislipemia, siendo las diferencias entre ambos grupos (DV cortical y control) estadísticamente significativas ( $p=0,027$ ).

En el grupo de DV subcortical, 92 pacientes tenían antecedentes de HTA (86,8%) siendo las diferencias entre sujetos con DV subcortical y controles estadísticamente significativas ( $p=0,001$ ). En cuanto a la DM, 34 pacientes (32,1%) con DV subcortical eran diabéticos, encontrándose las diferencias entre individuos con DV subcortical y controles en el límite de la significación estadística ( $p=0,050$ ). Por último, en cuanto a la dislipemia, 106 pacientes (62,3%) presentaban dislipemia, siendo las diferencias entre ambos grupos (DV subcortical y control) estadísticamente significativas ( $p=0,001$ ).

Los resultados se pueden observar resumidos en la tabla 8 y figura 5.

**Tabla 8:** Distribución de los factores de riesgo vascular según el subtipo de DV

		DV MULTIINFARTO O CORTICAL N(%)	DV SUBCORTICAL N(%)
HTA	SI	80 (78,4%)	92 (86,8%)
	NO	22 (21,6%)	14 (13,2%)
DM	SI	38 (37,3%)	34 (32,1%)
	NO	64 (62,7%)	72 (67,9%)
DISLIPEMIA	SI	53 (52%)	66 (62,3%)
	NO	49 (48%)	70 (37,7%)

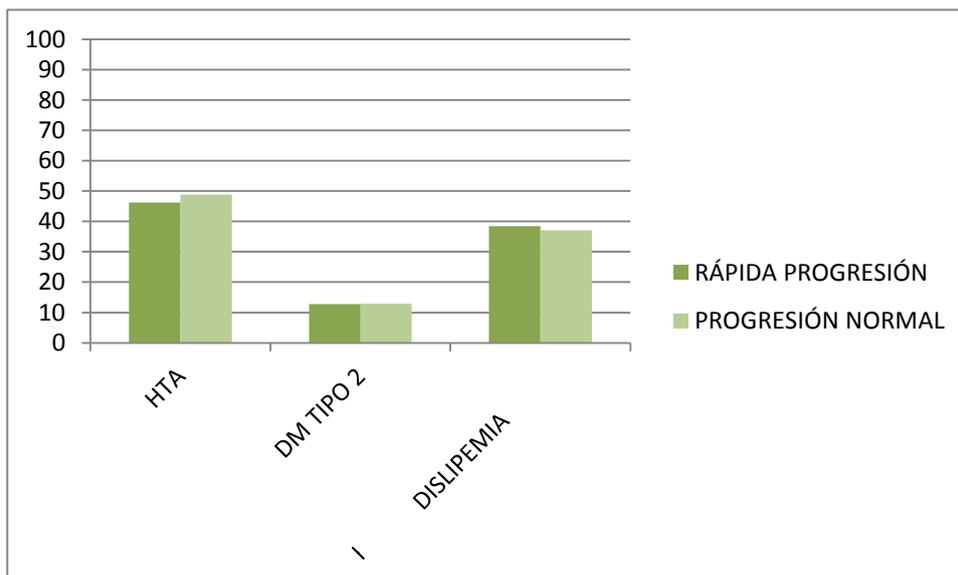


**Figura 5:** Porcentaje de los diferentes factores de riesgo vascular según subtipo de DV

Cuando se compararon los diferentes factores de riesgo según el tipo de progresión objetivado en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA), se observó que dentro de grupo de los pacientes con EA de progresión rápida 18 pacientes (46,2%) tenían antecedentes de HTA encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre este subgrupo y el grupo control ( $p=0,005$ ). Respecto a la DM, 5 pacientes (12,8%) de los pacientes con EA de rápida progresión eran diabéticos, siendo las diferencias con respecto a los controles no estadísticamente significativas ( $p=0,194$ ). En cuanto a la dislipemia, 15 pacientes (38,5%) presentaban hipercolesterolemia, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,970$ ).

En el grupo de progresión normal de la EA, 87 pacientes tenían antecedentes de HTA (48,9%) siendo las diferencias entre este subgrupo y el grupo control estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ). En cuanto a la DM, 23 pacientes (12,9%) en el grupo con progresión normal de la EA eran diabéticos, siendo las diferencias entre dicho subgrupo y los controles estadísticamente significativas ( $p=0,020$ ). Por último, en cuanto a la dislipemia, 66 pacientes (37,1%) presentaban hipercolesterolemia, sin encontrarse diferencias entre ambos grupos estadísticamente significativas ( $p=0,729$ ). Los resultados se pueden observar resumidos en la tabla 9 y figura 6.

<b>Tabla 9: Distribución de los factores de riesgo vascular según la progresión de EA</b>			
		<b>PROGRESIÓN RÁPIDA N(%)</b>	<b>PROGRESIÓN NORMAL N(%)</b>
<b>HTA</b>	<b>SI</b>	18 (46,2%)	87 (48,9%)
	<b>NO</b>	21 (53,8%)	91 (51,1%)
<b>DM</b>	<b>SI</b>	5 (12,8%)	23 (12,9%)
	<b>NO</b>	34 (87,2%)	155 (87,1%)
<b>DISLIPEMIA</b>	<b>SI</b>	15 (38,5%)	66 (37,1%)
	<b>NO</b>	24 (61,5%)	112 (62,9%)



**Figura 6:** Porcentaje de los diferentes factores de riesgo vascular según la progresión de EA

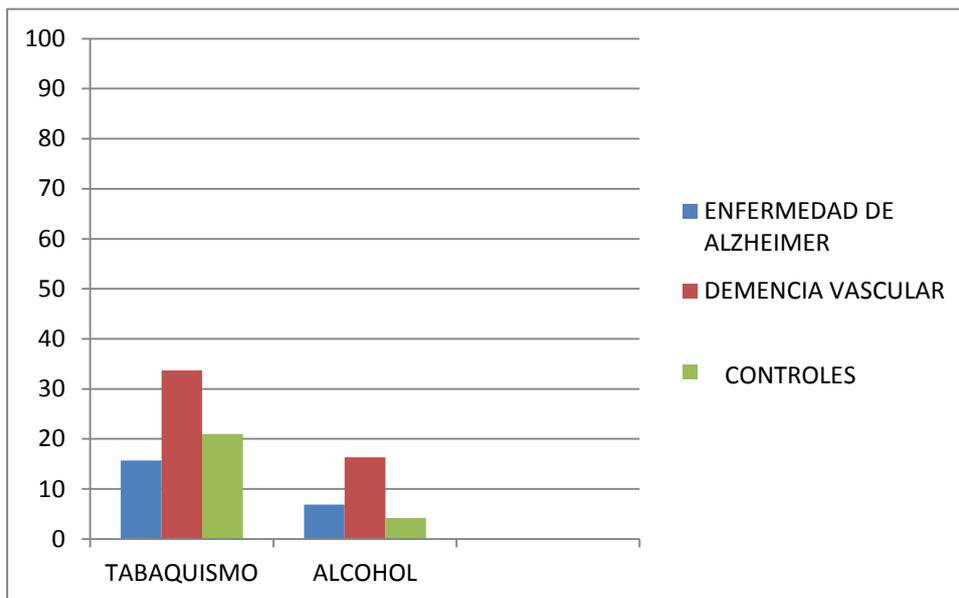
### 5. HÁBITOS TÓXICOS:

Respecto a los hábitos tóxicos se estudiaron el hábito tabáquico y el enolismo. Los resultados obtenidos mostraron un mayor consumo de tabaco entre los pacientes con Demencia Vascolar (33,7%), respecto al grupo control (21%) y al de Enfermedad de Alzheimer (15,7%). En el caso concreto de los sujetos con Demencia Vascolar, las diferencias observadas en comparación con el grupo control alcanzaron significación estadística ( $p=0,004$ ) (tabla 112) (Figura 44)

Respecto al abuso de alcohol, los resultados obtenidos mostraron un consumo de alcohol de casi el doble entre los pacientes con Demencia Vascolar (16,3%), respecto a los pacientes con Enfermedad de Alzheimer (6,9%) y de casi el triple respecto al grupo control (4,2%). En el grupo de Demencia Vascolar las diferencias observadas frente a los controles fueron estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ). (Tabla 10) (Figura7)

**Tabla 10:** Distribución de los hábitos tóxicos en los grupos de estudio

		ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N(%)	DEMENCIA VASCULAR N(%)	CONTROLES N(%)
TABAQUISMO	SI	34 (15,7%)	70 (33,7%)	45 (21%)
	NO	183 (84,3%)	138 (66,3%)	169 (79%)
CONSUMO DE ALCOHOL	SI	15 (6,9%)	34 (16,3%)	9 (4,2%)
	NO	202 (93,1%)	174 (83,7%)	205 (95,8%)

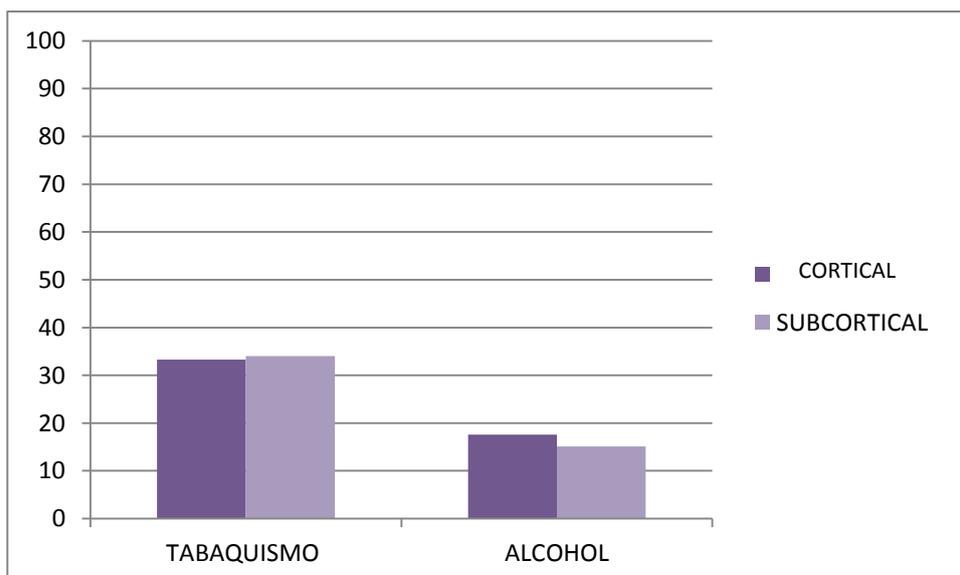


**Figura 7:** Porcentaje de hábitos tóxicos en los grupos de estudio

Cuando se compararon los diferentes hábitos tóxicos según el subtipo de demencia vascular, se observó una distribución similar de fumadores y de enolismo en ambos grupos. Respecto al grupo de DV cortical se observó que las diferencias frente al grupo control tanto en el consumo de alcohol como en cuanto al hábito tabáquico fueron estadísticamente significativas ( $p=0,0001$  y  $p=0,018$ , respectivamente). Este hecho también se observó en la comparativa entre el grupo de DV subcortical y el grupo control ( $p=0,001$  respecto al consumo de alcohol y  $p=0,012$  para el hábito tabáquico) (Tabla 11; Figura 8)

**Tabla 11:** Distribución de hábitos tóxicos según el subtipo de DV

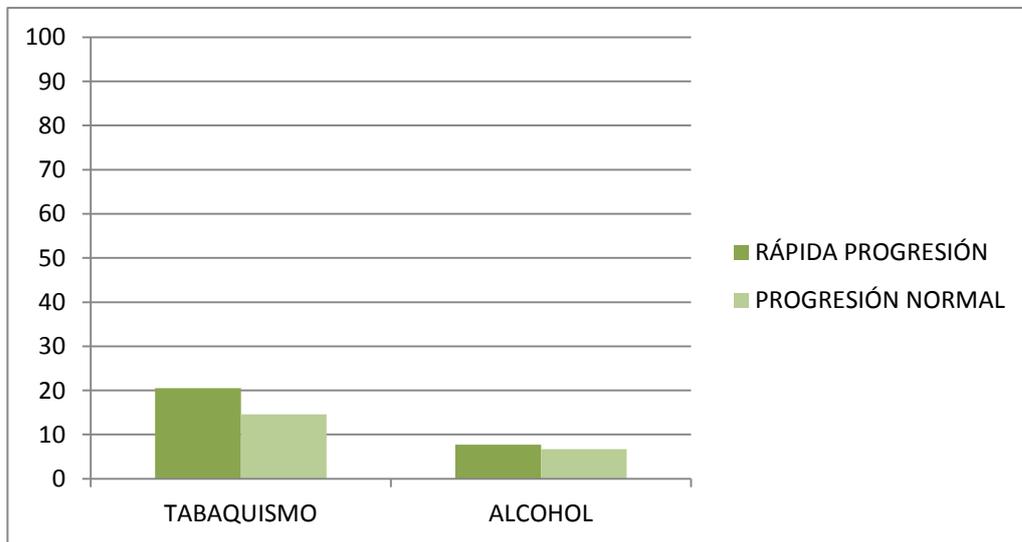
		DEMENCIA VASCULAR CORTICAL N(%)	DEMENCIA VASCULAR SUBCORTICAL N(%)
TABAQUISMO	SI	34 (33,3%)	36 (34%)
	NO	68 (66,7%)	70 (66%)
CONSUMO DE ALCOHOL	SI	18 (17,6%)	16 (15,1%)
	NO	84 (82,4%)	90 (84,9 %)



**Figura 8:** Porcentaje de hábitos tóxicos entre los subtipos de DV

Respecto al estudio de los hábitos tóxicos en el grupo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA) se observó que el consumo era mayor en el grupo de progresión rápida que en el grupo de progresión normal. Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos grupos en comparación con el grupo control. (Tabla 12; Figura 9)

<b>Tabla 12:</b> Distribución de hábitos tóxicos según la progresión en el grupo de EA			
		<b>EA DE RÁPIDA PROGRESIÓN N(%)</b>	<b>EA DE PROGRESIÓN NORMAL N(%)</b>
<b>TABAQUISMO</b>	<b>SI</b>	8 (20,5%)	26 (14,6%)
	<b>NO</b>	31 (79,5%)	152 (85,4%)
<b>CONSUMO DE ALCOHOL</b>	<b>SI</b>	3 (7,7%)	12 (6,7%)
	<b>NO</b>	36 (92,3%)	166 (93,3 %)



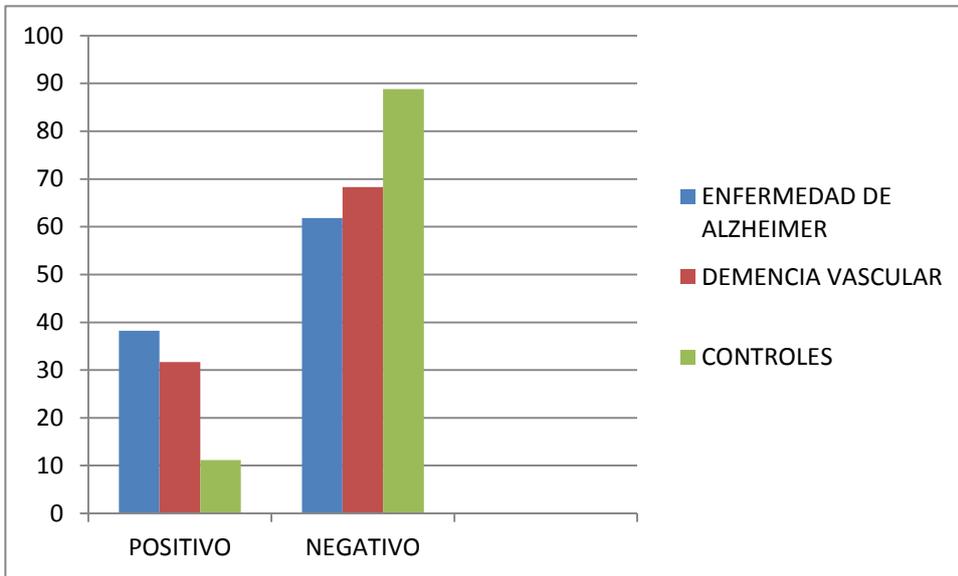
**Figura 9:** Porcentaje de hábitos tóxicos según la progresión en EA

## 6. POLIMORFISMO APOE $\epsilon$ 4

Se estudió la presencia del alelo APOE  $\epsilon$ 4 en los diferentes grupos de estudio. Se observó una proporción discretamente superior de portadores del alelo  $\epsilon$ 4 del polimorfismo APOE en el grupo de Enfermedad de Alzheimer (38,2%) respecto al grupo de Demencia Vascular (31,7%), y claramente superior al grupo control (11,2%). Tanto en el grupo de Enfermedad de Alzheimer como en el de Demencia Vascular las diferencias observadas frente al grupo control fueron estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ;  $p=0,0001$  respectivamente). (Tabla 13; Figura 10)

**Tabla 13:** Clasificación según APOE  $\epsilon$ 4 de la muestra

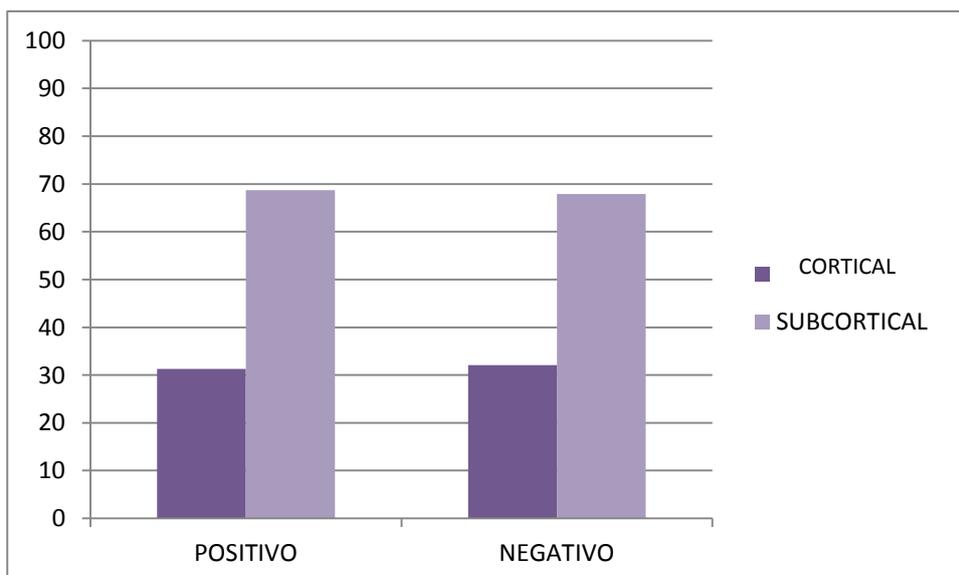
		ENFERMEDAD DE ALZHEIMER N(%)	DEMENCIA VASCULAR N(%)	CONTROL N(%)
APOE $\epsilon$ 4	POSITIVO	83 (38,2%)	66 (31,7%)	24 (11,2%)
	NEGATIVO	134 (61,8%)	142 (68,3%)	190 (88,8%)



**Figura 10:** Porcentaje de APOE ε4 en la muestra

Además, se estudió la presencia del alelo APOE ε4 según el subtipo de Demencia Vascular y se observó una distribución similar de portadores de dicho alelo en ambos subtipos. Dentro del subgrupo de DV cortical, se determinó que las diferencias en cuanto a portadores del alelo APOE ε4 entre este subgrupo y el de control eran estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ). Esto también sucedía en la comparativa entre el grupo de DV subcortical y los controles ( $p=0,0001$ ) (Tabla 14: Figura 11)

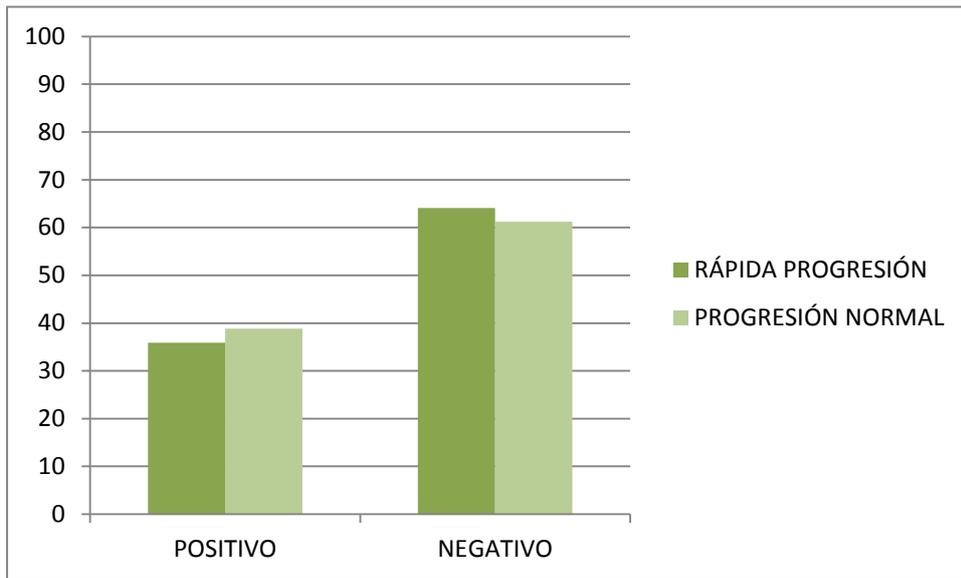
<b>Tabla 14:</b> Clasificación de la APOE ε4 según el subtipo de DV			
		<b>DV MULTIINFARTO N(%)</b>	<b>DV SUBCORTICAL N(%)</b>
<b>APOE ε4</b>	<b>POSITIVO</b>	32 (31,3%)	34 (32,1%)
	<b>NEGATIVO</b>	70 (68,7%)	72 (67,9%)



**Figura 11:** Porcentaje de distribución de APOE ε4 según el subtipo de DV

Respecto a la distribución del alelo APOE ε4 según la progresión en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA), se observó una distribución similar de dicho alelo con independencia de la velocidad de progresión de la EA. Tanto en el grupo de EA de rápida progresión como en la EA de progresión normal se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia del alelo APOE ε4 frente al grupo control ( $p=0,0001$ ;  $p=0,001$  respectivamente). (Tabla 15; Figura 12)

<b>Tabla 15:</b> Distribución de APOE ε4 según la progresión en la EA			
		<b>EA RÁPIDA PROGRESIÓN N (%)</b>	<b>EA PROGRESIÓN NORMAL N (%)</b>
<b>APOE ε4</b>	<b>POSITIVA</b>	14 (35,9%)	69 (38,8%)
	<b>NEGATIVA</b>	25 (64,1%)	109 (61,2%)



**Figura 12:** Porcentaje de distribución de APOE  $\epsilon$ 4 según la progresión en EA