

# Determinación de la frecuencia del haplotipo H1/H2 de MAPT en muestras de población mestiza mexicana

Dávila-Ortiz de Montellano DJ, Yescas-Gómez P, Alonso-Vilatela Ma E.

## RESUMEN

Mediante diversos estudios anatomopatológicos y genéticos se ha posicionado a la proteína asociada a microtúbulos *tau* (MAPT 17q21.1), en el centro de la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas denominadas taupatías: parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración cortico-basal (CBD), enfermedad de Alzheimer (AD), demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), neurodegeneración asociada a pantotenasa cinasa (PKAN), complejo de parkinsonismo – demencia de Guam, enfermedad de Pick, y enfermedad de Parkinson (EP), entre otras. El locus de MAPT es estructuralmente complejo, conteniendo un polimorfismo invertido de aproximadamente 900 kb que determina dos haplotipos distintos no recombinantes entre sí. H1 y H2, de orientación invertida y una delección intrónica de ~283pb. En el presente estudio se determinó la frecuencia de los alelos H1 y H2 así como de los genotipos determinados por estos, en una muestra de 205 controles y 127 pacientes con diagnóstico de EP esporádica. El grupo control mostró una frecuencia para el alelo H1 88.78% y para el alelo H2 11.22%, así como de los haplotipos H1/H1 80.49%; H1/H2 16.59% y H2/H2 2.93%, encontrándose en equilibrio de Hardy-Weinberg. En el grupo de pacientes el alelo H1 mostró una frecuencia de 91.73% y el alelo H2 de 8.27%, así como de los haplotipos H1/H1 83.46% y H1/H2 16.54%, encontrándose en desequilibrio de Hardy-Weinberg. Al comparar ambos grupos, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las variables consideradas (genotipo, sexo y edad), sólo se observó tendencia marcada por la ausencia del genotipo H2/H2 en el grupo de pacientes con EP. La frecuencia alélica de H1 es similar a la reportada para poblaciones norteamericanas, europeas y asiáticas, mientras que la frecuencia alélica de H2 es menor que en caucásicos y similar a la reportada en África y Asia aunque distinta a lo reportado en otras poblaciones americanas (Colombia y Brasil). Éste es el primer estudio que determina las frecuencias de los alelos H1 y H2 de MAPT, así como los genotipos en una muestra de sujetos mestizos mexicanos.

**Palabras clave:** MAPT, proteína *Tau*, enfermedad de Parkinson, población mestiza mexicana.

---

## Determining the frequency of MAPT H1/H2 haplotype in Mexican mestizo population samples

## ABSTRACT

Pathological and genetic studies have positioned the microtubule associated protein Tau (MAPT 17q21.1) in the center of the pathogenesis of several diseases known as tauopathies: progressive supranuclear palsy (PSP), corticobasal degeneration (CBD), Alzheimer's disease (AD), frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), neurodegeneration with brain iron accumulation 1 (NBIA1), complex of parkinsonism-dementia of Guam, Pick's disease and Parkinson's disease (PD) among others. MAPT locus is structurally complex, containing a polymorphism of approximately 900 kb; this polymorphism creates two reverse orientation, non-recombinant, haplotypes, H1 and H2, with a ~283pb deletion. In this study we ascertained the frequency of H1 and H2 alleles and the genotypes determined by them, the control group showed the next allelic frequencies: 88.78% for the H1, 11.22% for the h2 allele; for the haplotypes H1/H1; H1/H2 and H2/H2 the frequencies were of 80.49%, 16.59% and 2.93%, respectively all of these haplotypes were in Hardy-

Weinberg equilibrium. In the patient group H1 allele showed a frequency of 91.73% and H2 allele of 8.27%. The haplotypes frequency were: 83.46% for H1/H1 and 16.54% for H1/H2, no H2/H2 subjects were observed, these frequencies were not in Hardy-Weinberg equilibrium. When comparing both groups, a significant statistically difference in terms of the genotype, sex and age, only a trend marked by the absence of H2/H2 genotype in the group of patients with PD. The allelic frequency for H1 is similar to that reported in North American, European and Asian populations, while the H2 allelic frequency is lower than that reported for Caucasians, although higher than in Africa and Asia, likewise, different with other American populations (Colombia and Brazil) This is the first study that determinates the allelic and genotypes frequencies of MAPT H1 and H2 in a sample of Mexican mestizo subjects.

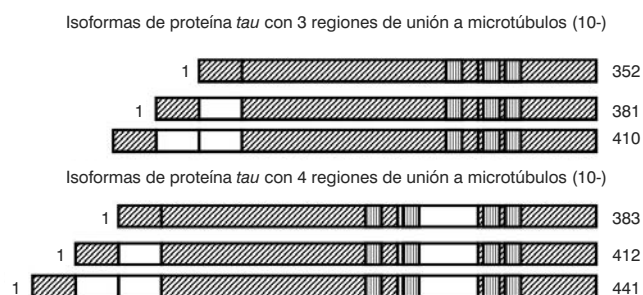
**Key words:** MAPT, protein *tau*, Parkinson's disease, Mexican mestizo population samples.

**E**studios recientes han determinado que cerca del 10% del genoma humano es polimórfico, y la presencia de estas variaciones aporta una gran contribución en la susceptibilidad y evolución de distintos padecimientos<sup>1,2</sup>, dentro de los que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas.

Mediante diversos estudios anatomopatológicos y genéticos se ha posicionado a la proteína asociada a microtúbulos *tau* (MAPT 17q21.1) en el centro de la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas denominadas taupatías<sup>3</sup>.

La proteína asociada a microtúbulos *tau* (proteína *tau*) es la promotora del ensamblaje y estabilización de la red de microtúbulos, se expresa tanto en el cerebro en desarrollo como en el adulto, esencial para el transporte axonal normal en las neuronas<sup>4,5</sup>.

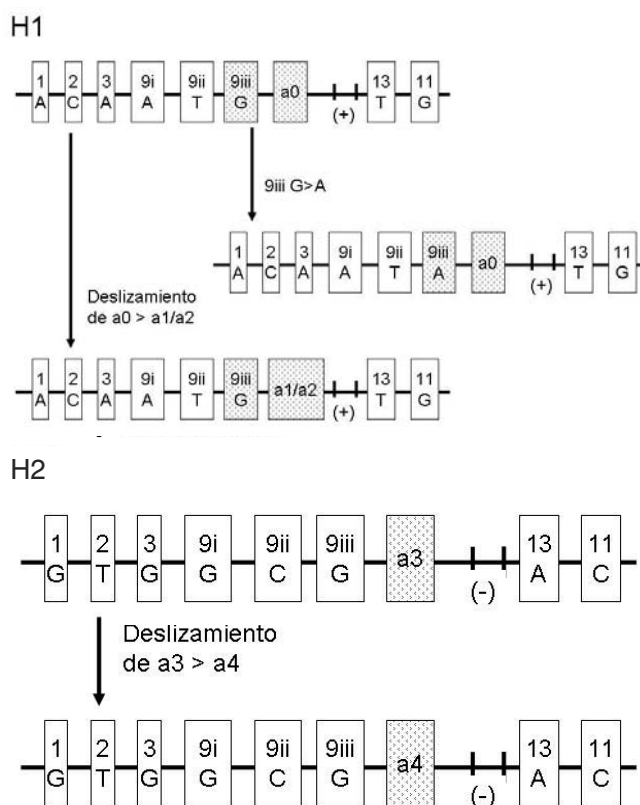
Existen seis isoformas de la proteína *tau* (figura 1), generados por *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10, los exones 9-12 codifican para dominios de unión a microtúbulos, que son repetidos imperfectos de 31 o 32 residuos. El *splicing* alternativo del exón 10 genera isoformas con 4 (exón 10+) o tres (exón 10-) dominios de unión a microtúbulos<sup>6</sup> en apariencia presentan funciones específicas<sup>7</sup>.



**Figura 1.** Las seis principales isoformas de *tau*. Las regiones constantes se encuentran sombreadas en líneas diagonales, los exones 2, 3 y 10 se encuentran en blanco, las regiones de unión a microtúbulos, incluidas en los exones 9 - 12 se encuentran sombreadas con líneas verticales. (Modificado de Barker, M. et al).

El locus de MAPT es estructuralmente complejo, conteniendo un polimorfismo invertido de aproximadamente 900 kb que determina dos haplotipos distintos no

recombinantes entre sí<sup>6,8</sup>. H1, de orientación directa y H2, de orientación invertida que también se encuentra definido por la presencia de una delección de ~283pb. El haplotipo H1 es evolutivamente dinámico, y contiene 3 subhaplotipos, mientras que el haplotipo H2 es más estable, presentando sólo 2 subhaplotipos (figura 2).



**Figura 2.** Representación de los haplotipos de *tau*; El haplotipo H1 y el H2 se diferencian entre sí por la inversión delección, mientras que las diferencias entre los subhaplotipos están determinadas por SNPs (polimorfismos de nucleótido sencillo) y el repetido TG a0-a4, mostrados en cajas sombreadas (Modificado de Barker, M. et al).

Recibido: 3 noviembre 2010. Aceptado: 3 diciembre 2010.

Departamento de Neurogenética del Instituto Nacional Neurología y Neurocirugía. Correspondencia: Dávila-Ortiz de Montellano DJ. Departamento de Neurogenética del Instituto Nacional Neurología y Neurocirugía. Insurgentes Sur 3877. Col. La Fama, 14269, México, D.F. E-mail: elisaav@servidor.unam.mx

Las enfermedades caracterizadas por acumulación intraneuronal de proteína *tau*, llamadas taupatías, en filamentos anormales son la parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración cortico-basal (CBD), enfermedad de Alzheimer (AD), demencia fronto-temporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), neurodegeneración asociada a pantotenasa cinasa (PKAN), complejo de parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de Pick, y de Parkinson (EP), entre otras<sup>5,6,8</sup>.

La EP es una enfermedad crónica degenerativa con una prevalencia acumulativa de uno por cada mil personas mayores a 75 años<sup>9</sup> y afecta a por lo menos 6 millones de personas a nivel mundial<sup>10</sup>. Menos del 15% de los casos son familiares y de estos, menos del 10% pueden atribuirse a una causa genética subyacente (PARK1, PARK3, PARK5, PARK7, PARK8) entre otras<sup>11</sup>.

Las mutaciones en MAPT se asocian a neuropatologías *tau*-positivas y en la FTDP-17 ocurren en frecuencias que varían entre el 5 y el 50% de las familias con transmisión autosómica dominante<sup>12-14</sup>. Aunque no se han encontrado mutaciones deletéreas en casos esporádicos de taupatías, varios autores han asociado al haplotipo H1 en distintas poblaciones de pacientes con diagnósticos de EP, PSP, CBD, AD y FTDP-17 como factor de riesgo<sup>15</sup>.

Los sujetos homocigotos para el haplotipo H1/H1, en apariencia se encuentran en mayor riesgo de desarrollar PSP, CBD, EP, y demencia fronto-temporal; sin embargo, en algunas poblaciones se ha relacionado el haplotipo H2<sup>16</sup>, aunque el mecanismo de esta asociación no es claro<sup>17,18</sup>. Algunos autores han encontrado diferencias en la distribución de los haplotipos H1 y H2 que indican una participación dependiente del grupo étnico en la patogénesis de las taupatías relacionadas<sup>19</sup>.

El alelo H1 es muy común, encontrándose en el 70 al 94.7%<sup>6,21,18</sup> de poblaciones norteamericanas, europeas y asiáticas, mientras que el H2 se considera raro en africanos y casi ausente en asiáticos, mientras que en caucásicos se presenta con una frecuencia de entre el 20 y 30%<sup>19,20</sup> por lo que se le ha considerado casi exclusivo de este grupo étnico.

## OBJETIVOS

Determinar la frecuencia de los haplotipos H1 y H2 en población mestiza mexicana sana.

Analizar la frecuencia de los genotipos determinados por los haplotipos H1 y H2 en población mestiza mexicana sana.

Determinar la frecuencia de los genotipos determinados por los haplotipos H1 y H2 en población mestiza mexicana con diagnóstico de enfermedad de Parkinson.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Considerando que se ha reportado una frecuencia mínima de 5.3% para el alelo H2, esperando un nivel de confianza del 95% y una precisión del 3%<sup>21</sup>. Se calcula un tamaño de muestra mínima de 214 alelos en controles y 214 alelos en pacientes.

Se incluyeron 205 muestras (100 masculinos y 105 femeninos) de ADN de banco de controles de sujetos mestizos (nacidos en México y que ambos padres y al menos tres de sus abuelos sean de ascendencia mexicana) sanos (definidos por la ausencia de patología neurodegenerativa detectable clínicamente al momento de la toma de muestra) mayores de 18 años que hayan aceptado, bajo consentimiento informado, participar en estudios del Departamento de Neurogenética y Biología Molecular de este Instituto como controles sanos.

De la misma manera, se seleccionaron 127 muestras del banco de ADN de pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico confirmado de EP por neurólogo experto en movimientos anormales, que sean casos esporádicos, es decir, sin antecedentes en primero o segundo grado de enfermedad de Parkinson.

El DNA se extrajo de muestras de sangre periférica mediante método convencional estandarizado en el Departamento de Neurogenética (TTS).

La calidad del material genético obtenido se analizó mediante electroforesis de DNA genómico en gel de agarosa al 1% y se cuantificó por espectrometría a 260 y 280 nm.

La técnica de PCR para el análisis molecular y discriminación alélica se realizó mediante PCR empleando las condiciones descritas por Conrad *et al*<sup>22</sup>, Baker *et al*<sup>6</sup>.

Los datos obtenidos fueron capturados en una base de datos y analizados mediante el paquete estadístico SPSS 15.0 empleando estadística descriptiva para establecer la frecuencia genotípica y alélicas H1 y H2 en la población estudiada; así mismo, se corroboró la presencia de equilibrio de Hardy Weinmberg tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes.

El presente estudio cumple con lo estipulado en el título segundo del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud<sup>23</sup> y apego a la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial<sup>24-28</sup>.

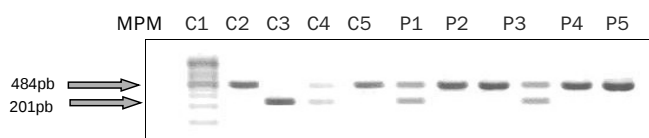
## RESULTADOS

Se incluyeron 205 controles; 100 de sexo masculino (48.78%) y 105 de sexo femenino (51.22%) con una edad promedio al momento del estudio de 24.7±17.5 (18 a 53) años sin encontrar diferencias significativas entre los

grupos por género y edad.

Dentro del grupo de pacientes con EP se incluyeron 127 muestras, 79 de sexo masculino (62.2%) y 48 femeninas (37.8%), siendo esta diferencia en la distribución estadísticamente significativa ( $p=0.01$ ). La edad promedio al momento del estudio fue de  $59 \pm 13$  (86 a 18) años, con una edad de inicio del padecimiento promedio de  $48.6 \pm 30.57$  (74 a 13) años y con una duración de la enfermedad hasta el momento del estudio de  $10.3 \pm 13$  (1-27) años.

Tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes se realizó amplificación mediante técnica de PCR con las condiciones descritas por Conrad et al<sup>29</sup>, Baker et al<sup>6</sup>, los productos de PCR se corrieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para realizar la discriminación alélicas (figura 3).



**Figura 3.** Gel de agarosa al 2.5% que muestra los productos de PCR para el polimorfismo H1-H2. MPM: marcador de peso molecular (100bp Ladder DNA Marker Axygen); C1 – C5: Controles sanos; P1 – P5 pacientes con diagnóstico de EP. La banda sencilla de 484pb indica homocigocidad para el alelo H1; la banda sencilla de 201pb indica homocigocidad para el alelo H2, mientras que la presencia de una banda de 484pb y una de 201pb indica heterocigocidad H1/H2.

En el grupo control se determinó la presencia de alelos H1 y H2; siendo para el alelo H1 88.78% (364) y para el alelo H2 11.22% (46); así como de los haplotipos H1/H1 80.49% (165); H1/H2 16.59% (34) y H2/H2 2.93% (6), encontrándose en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2=5.75$ ;  $p=0.05$ )<sup>25</sup>.

La frecuencia encontrada del alelo H1 (88.78%) es similar a la reportada en poblaciones norteamericanas, europeas y asiáticas (70 a 94.7%), mientras que la frecuencia del alelo H2 (11.22%) es menor a la reportada en caucásicos (20–30%) aunque mayor que en africanos y asiáticos; asimismo, se observan diferencias con otras poblaciones americanas (Colombia y Brasil) donde el alelo H2 se ha reportado ausente<sup>25-30</sup> (cuadro 1).

Al comparar los grupos de controles y pacientes, no se observó una diferencia estadística significativa en cuanto a las variables consideradas (sexo y edad), ni en cuanto a las frecuencias alélicas (cuadro 2) y frecuencias genotípicas (cuadro 3).

Al determinar la frecuencia de alelos H1 y H2 en el grupo de pacientes se encontró para el alelo H1 una frecuencia de (91.73%) (233) y para el alelo H2 de 8.27% (21), así como de los haplotipos H1/H1 83.46% (106); H1/H2 16.54% (21) y H2/H2 0% (0) encontrándose en desequilibrio

**Cuadro 1.** Frecuencia alélicas H1 y H2 de acuerdo al origen étnico (modificado de Witney E. et al)

| Población  | N   | %H1 | %H2 |
|------------|-----|-----|-----|
| Caucásicos | 88  | 80  | 20  |
| Italia     | 29  | 71  | 29  |
| Francia    | 48  | 83  | 17  |
| Pakistán   | 86  | 90  | 10  |
| África     | 104 | 87  | 13  |
| Asia       | 395 | 99  | 1   |
| Colombia   | 11  | 100 | 0   |
| Brasil     | 34  | 100 | 0   |
| Mayas      | 25  | 96  | 4   |
| Mestizos   | 205 | 89  | 11  |
| Mexicanos* |     |     |     |

**Cuadro 2.** Frecuencias alélicas de H1 y H2 en controles y pacientes con EP.

| Alelos | Controles | Pacientes |
|--------|-----------|-----------|
| H1     | 364       | 233       |
| (%)    | (88.8%)   | (91.7%)   |
| H2     | 46        | 21        |
| (%)    | (11.2%)   | (8.27%)   |
| Total  | 410       | 254       |

\* $P>0.05$

**Cuadro 3.** Frecuencias genotípicas H1/H2 en controles y pacientes con EP.

| Genotipos | Controles | Pacientes |
|-----------|-----------|-----------|
| H1/H1     | 165       | 106       |
|           | (80.5%)   | (83.5%)   |
| H1/H2     | 34        | 21        |
|           | (16.6%)   | (16.5%)   |
| H2/H2     | 6         | 0         |
|           | (2.9%)    |           |
| Total     | 205       | 127       |

\* $P>0.05$

de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 1.03$ ;  $P>0.05$ )<sup>31</sup>. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al genotipo, sexo, años de evolución o edad de inicio dentro de este grupo.

Se observó una tendencia marcada por la ausencia del genotipo H2/H2 en el grupo de pacientes con EP; así como, una frecuencia mayor de sujetos masculinos con EP comparada contra los controles, sabiendo que esta patología es más frecuente en sujetos masculinos que en femeninas.

## CONCLUSIONES

La proteína *tau* asociada a microtúbulos (MAPT) ha mostrado importancia fisiopatológica dentro de taupatías, entre las que se encuentra la enfermedad de Parkinson<sup>5,6,8</sup>; sin embargo, sólo en pocos casos familiares se han demostrado mutaciones en esta<sup>9-11</sup>.

Este es el primer estudio que determina las frecuencias de alelos H1 y H2 de MAPT, así como los genotipos en una muestra de sujetos mestizos mexicanos.

En el grupo de pacientes el alelo H1 mostró una frecuencia de 91.73% y el alelo H2 de 8.27%, así como de los haplotipos H1/H1 83.46% y H1/H2 16.54%, encontrándose en desequilibrio de Hardy-Weinberg.

Se observa una mayor frecuencia de alelos H1, así como del genotipo H1/H1, y ausencia del genotipo H2/H2 en pacientes con enfermedad de Parkinson; a pesar de no encontrarse significancia estadística, esto puede señalar implicaciones en la fisiopatología de la enfermedad, aunque se conoce que la proporción de los haplotipos de MAPT y su relación con taupatías puede ser dependiente de el origen étnico de la muestra analizada<sup>20</sup>.

Será necesario ampliar este estudio aumentando el tamaño muestral tanto de controles como pacientes con enfermedad de Parkinson con la finalidad de corroborar la participación de los alelos H1 y H2 en nuestra población; asimismo, incluyendo pacientes con diagnóstico de otras taupatías.

## REFERENCIAS

- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006;7: 85-97.
- Álmos P, Horváth S, Czibula Á. H1 tau haplotype-related genomic variation at 17q21.3 as an Asian heritage of the European Gypsy population. *Heredity* 2008;101: 416-9.
- Foster NLK, Wilhelmsen AA, Sima MZ, Jones CJ, D'Amato, S, Gilman. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. *Ann Neurol* 2000;41:706-15.
- García ML, Cleveland DW. Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:41-8.
- Jiang Z, Cote J, Kwon J. Aberrant Splicing of tau Pre-mRNA Caused by Intronic Mutations Associated with the Inherited Dementia Frontotemporal Dementia with Parkinsonism Linked to Chromosome 17. *Mol and Cell Biol* 2000;20(11):4036-48.
- Baker M, Litvan I, Houlihan H. Association of an extended haplotype in tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 1999;8(4): 711-15.
- Goode B, Chau M, Denis P, Feinstein S. Structural and Functional Differences between 3-Repeat and 4-Repeat Tau Isoforms. *J of Biol Chem* 2000;275(49):38128-39.
- Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, et al. A common inversion under selection in Europeans. *Nat Genet* 2005; 37: 129-37.
- Poorkaj P, Grossman M, Steinbart E, Payami H, Sadovnick A, Nochlin D, et al. Frequency of tau gene mutations in familial and sporadic cases of non-Alzheimer dementia. *Arch Neurol* 2002;58:383-7.
- Dumanchin C, Camuzat A, Campion D, Verpillat P, Hannequin D, Dubois B, et al. Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. *Hum Mol Genet* 1998; 7:1825-9.
- Zee J van der, Rademakers R, Engelborghs S, Gijssels I, Bogaerts V, Vandenberghe R, et al. A Belgian ancestral haplotype harbours a highly prevalent mutation for 17q21-linked tau-negative FTL. *Brain* 2006;129:841-52.
- Vandrovcova J, Pittman A, Malzer, E. Association of MAPT haplotype - tagging SNPs with sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2009;30:1477-28.
- Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Rinne UK. Changing epidemiology of Parkinson's disease in Southwestern Finland. *Neurology* 1999; 52: 302-8.
- Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2007;16(2),R183-R194.
- Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009;18(R1):R48-R59.
- Maraganore DM. Interaction of alpha-synuclein and tau genotypes in Parkinson's disease. *Neurol* 2005;439-43.
- Fung HC, Scholz S, Matarin M, Simon-Sanchez J, Hernandez, Britton A, et al. Genomewide genotyping in Parkinson's disease and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol* 2006; 5,911-6.
- Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms of the tau gene with late-onset Parkinson disease. *JAMA* 2001; 286, 2245-50.
- Winkler, S, König, I. R, Lohmann-Hedrich, K, Vieregge, P, Kostic, V. & Klein, C. Role of ethnicity on the association of MAPT H1 haplotypes and subhaplotypes in Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet* 2007;15, 1163-8.
- Zabetian CP, Hutter CM, Factor SA, Nutt JG, Higgins DS, Griffith A, et al. Association analysis of MAPT H1 haplotype and subhaplotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2007;62, 137-44.
- Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, Beecham GW, Wang L, et al. Genome-Wide Association Study Confirms SNPs in SNCA and the MAPT Region as Common Risk Factors for Parkinson Disease. *Ann Hum Genet* 2010;74:97-109.
- Kaivorinne AL, Krüger J, Kuivaniemi K, Tuominen H, Moilanen V, Majamaa K, Remes A. Role of MAPT mutations and haplotype in frontotemporal lobar degeneration in Northern Finland. *BMC Neurol* 2008; 8:48.
- Kar A, Kuo D, He R, Zhou J, Wu J. Tau alternative splicing and fronto-temporal dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2005; 19(Suppl 1):S29-S36.
- Verpillat, P, Camuzat, A, Hannequin D, et al. Association Between Extended tau Haplotype and Frontotemporal Dementia. *Arch Neurol* 2002;59:935-9.
- Evans W, Fung HC, Steel J, Eerola J, Tienari P, Pittman A, et al. The tau H2 haplotype is almost exclusively caucasian in Origin. *Neurosci Lett* 2004;369:183-5.
- Stefansson H, Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, Barnard J, et al. A common inversion under selection in Europeans. *Nat Genet* 2005;37: 129-37.
- Luis Carlos Silva Aycaguer. Muestreo para la investigación en ciencias de la salud. Díaz de Santos, España, 1993.
- Conrad C, Andreadis A, Trojanowsky JQ, et al. Genetic evidence for the involvement of Tau in progressive supranuclear palsy.

- 
- Ann Neurol* 1997;2:259-73.
29. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.
30. 18ª Asamblea Médica Mundial Helsinki, Finlandia, junio de 1964 y enmendadas por la 29ª Asamblea Médica Mundial Tokio, Japón, octubre de 1975, por la 35ª Asamblea Médica Mundial Venecia, Italia, octubre de 1983 y por la 41ª Asamblea Médica Mundial Hong Kong, en septiembre de 1989 48 Asamblea general Somerset West, Sudáfrica octubre del 1996, 52ª Asamblea General Edimburgo, Escocia 2000.
31. Rodríguez, TR Gaunt and I Day. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing or Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *Ame J Epidemiol* Advance Access published on January 6, 2009. DOI 10.1093/aje/kwn359.