



10524
31
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

BUSQUEDA DE MUTACIONES EN LOS EXONES 5, 6, 7, 8
Y 11 DEL GEN DE PRESENILINA-1(PS1), EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR
DE INICIO TEMPRANO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
ELOÍNA GUTIÉRREZ RAMÍREZ

ASESORAS:
Q.F.B. PETRA YESCAS GÓMEZ
Dra. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2003

A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

Búsqueda de mutaciones en los exones 5, 6, 7, 8 y 11 del gen de
Presenilina-1 (PS1), en pacientes con enfermedad de Alzheimer
familiar de inicio temprano.
que presenta la pasante: Eloína Gutiérrez Ramírez
con número de cuenta: 9207459-6 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de abril de 2003

PRESIDENTE Q.F.B. Ma Esther Revuelta Miranda

VOCAL Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

SECRETARIO Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez

PRIMER SUPLENTE Q.F.I. Guadalupe Koizumi Castro

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Tais Nopal Guerrero

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

Dedicatorias y Agradecimientos

A Dios:

Por permitirme la dicha de vivir y cumplir una de las metas más importantes de mi vida.

A mis padres:

*Aurelio Gutiérrez Victorino
Irene Ramírez Nava*

*Por darme la vida, su cariño, comprensión y apoyo desinteresado.
Por su infinita paciencia y por brindarme la oportunidad de estudiar
una carrera y con ello darme una de las más grandes herencias
que de ustedes pudiera recibir.*

.....Gracias los amo.

A mis hermanos:

Enrique, Rode, Aurelio y Nelly.

*Por todo el apoyo y la comprensión que en su momento y aún sin darse cuenta,
he recibido de cada uno de ustedes. Por todos los momentos compartidos
y por todas esas noches de desvelo juntos.... Gracias los quiero mucho.*

A:

Q.F.B. Petra Yescas Gómez

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

*Por el tiempo, la orientación y todas las facilidades
otorgadas para la elaboración de este trabajo.*

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**

*Este trabajo se realizó en el laboratorio
de Genética y Biología Molecular
del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez", con el apoyo de CONACYT
bajo la dirección de la Q.F.B. Petra Yescas Gómez.
Proyecto: 28664-M.*

TESIS CON
FALSO DE LA CEN

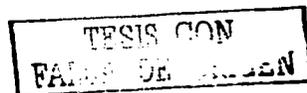
INDICE DE CONTENIDO

TEMA	PAGINA
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1 Demencia	3
1.2 Enfermedad de Alzheimer	4
1.2.1 Epidemiología	5
1.2.2 Clasificación	6
1.2.3 Características clínicas	7
1.2.4 Características neurohistopatológicas	9
1.2.5 Etiología	11
a) Patogenia	11
a.1) Producción del péptido β -amiloide	12
a.2) Hipótesis de la cascada amiloide	14
a.3) Mecanismo patogénico de la proteína tau	16
b) Genética de la Enfermedad de Alzheimer	18
b.1) Proteína Precursora Amiloide	18
b.2) Presenilina-1	20
b.3) Presenilina-2	23
c) Factores de riesgo asociados a la Enfermedad de Alzheimer	24
c.1) Factores de riesgo genéticos	24
c.1.1) Apolipoproteína E	25
c.1.2) Otros Genes	27
c.2) Factores de riesgo establecidos	28
c.3) Factores de riesgo probables	29
c.4) Otros posibles factores de riesgo	30
c.5) Heterogeneidad de la enfermedad de Alzheimer	32

E

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1.3	Presenilina-1	33
1.3.1	Estructura y localización del gen	33
1.3.2	Estructura y topología de la membrana	34
1.3.3	Conservación entre especies	36
1.3.4	Localización y expresión	37
1.3.5	Procesamiento y degradación	37
1.3.6	Funciones biológicas	39
	a) Modelos transgénicos	39
	b) Vía de Señalización Notch	40
	c) PS1 y actividad γ -secretasa	42
	d) Vía β -catenina	43
	e) Interacción con Nicastrina	45
	f) Otras funciones	46
1.3.7	Funciones patológicas	48
	a) Modificación del procesamiento de la APP	48
	b) Apoptosis y muerte celular	49
2.	OBJETIVOS	50
2.1	Objetivo general	51
2.2	Objetivos particulares	51
3.	MATERIAL Y METODOS	52
3.1	Material y reactivos	53
3.2	Material biológico	54
3.3	Diagrama de flujo	55
3.4	Obtención de la muestra	56
3.5	Extracción de ADN	56
3.6	Cuantificación de ADN	57
3.7	Reacción en Cadena de la Polimerasa	58
3.8	Electroforesis	60
3.9	Cinética enzimática	61
3.10	Digestión enzimática	61
3.11	Electroforesis	62
3.12	Hibridación en gota tipo Dot-blot	62



4.	RESULTADOS	64
	4.1 Extracción y cuantificación de ADN	65
	4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	66
	4.3 Cinética y digestión enzimática de los exones 5, 6, 7 y 8.	67
	4.4 Hibridación en gota tipo Dot-blot del exón 11.	76
5.	DISCUSION	77
6.	CONCLUSIONES	81
7.	ANEXOS	83
	7.1 Preparación de soluciones	84
	7.2 Índice de figuras	87
	7.3 Índice de tablas	88
	7.4 Glosario	89
8.	REFERENCIAS	93

ABREVIATURAS

a.a	Aminoácido
A β	Péptido β -amiloide
ACD	Acido cítrico dextrosa
ADN	Acido desoxirribonucleico
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora del β -amiloide
BHE	Barrera Hematoencefálica
BLCB	Amortiguador para lisis de células blancas
BLCR	Amortiguador para lisis de células rojas
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
dATP	Desoxi-adenosin-trifosfato
dCTP	Desoxi-citidin-trifosfato
dGTP	Desoxi-guanidin-trifosfato
Dll-1	Gen homólogo de Notch en <i>Drosophila melanogaster</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
D.O	Densidad óptica
dTTP	Desoxi-timidin-trifosfato
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAF	Enfermedad de Alzheimer familiar
Fig	Figura
GSK-3 β	Glutaminasasintetasa cinasa 3 β
HL	Región hidrofílica
HR	Región hidrofóbica
hrs	Horas
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez
KD	Kilodaltones
KO	Knockout
Lin-12	Gen homólogo de Notch en <i>C. elegans</i>
LRP	Receptor similar al receptor de lipoproteínas de baja densidad
M	Marcador de peso molecular
M	Molar
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
ng/ μ l	Nanogramos por microlitro
NICD	Dominio intracelular de Notch
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso molecular
PS1	Presenilina-1
PS2	Presenilina-2
RE	Retículo endoplásmico
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundos
Sel-12	Gen homólogo de PS1 en <i>C. elegans</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SSC	Solución salina de citratos
TBE	Amortiguador (Tris, Boratos y EDTA)
TCF	Factor de transcripción nuclear
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TM	Dominio transmembranal
U	Unidades
U/ μ l	Unidades por microlitro
U.V	Ultravioleta
V_f	Volumen final
VLDL-R	Receptor de lipoproteínas de muy baja densidad

α -2M	α -2 Macroglobulina
ϵ 2	Alelo épsilon 2 del gen de la APOE
ϵ 3	Alelo épsilon 3 del gen de la APOE
ϵ 4	Alelo épsilon 4 del gen de la APOE
λ	Longitud de onda
μ g	Microgramos
μ g/ml	Microgramos por mililitro
μ l	Microlitros
μ M	Micromolar

Abreviaturas (aminoácidos)

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Ans	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Glu	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V
Acido Aspártico	Asp	D
Acido glutámico	Glu	E

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Resumen

La enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia más común en el adulto mayor, es un trastorno neurodegenerativo, progresivo e irreversible de la corteza cerebral, caracterizado por la pérdida de la memoria y el deterioro de las funciones cognitivas, del pensamiento y de la conducta.

La enfermedad de Alzheimer se ha clasificado en: EA Familiar y EA Esporádica, ambas pueden ser tanto de inicio temprano, como de inicio tardío, la mayoría de los casos de EA son esporádicos y solo de un 5 a un 10 % representan casos familiares, los cuales siguen un patrón de herencia autosómica dominante.

Los estudios genéticos realizados en diferentes familias afectadas por la enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano (antes de los 65 años), han identificado a tres genes cuyas mutaciones son las responsables de la enfermedad: El gen para la *Proteína Precursora del β -amiloide* localizado en el cromosoma 21, el gen de *Presenilina-1* en el cromosoma 14 y el gen de *Presenilina-2* en el cromosoma 1.

Las estadísticas sobre los estudios de éstos genes indican que las mutaciones en el gen de *Presenilina-1* son las más frecuentes, responsables de hasta un 70% de los casos de EA familiar de inicio temprano, debido a esto en el presente trabajo se realizó un análisis de este gen en pacientes con herencia autosómica dominante, en los que se buscaron mutaciones en la región codificante que corresponden a los exones 5, 6, 7, 8 y 11.

El estudio de los exones 5, 6, 7 y 8 se llevó a cabo empleando enzimas de restricción, debido a que los sitios buscados en estos exones modifican un sitio de restricción. El exón 11 se realizó por medio de la hibridación de un oligonucleótido mutado y uno silvestre, utilizando la técnica de Dot-blot.

El análisis se realizó a 36 pacientes con probable enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano, atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suárez, en los que la búsqueda de mutaciones resulto negativa. Los pacientes no presentaron ninguna de las cinco mutaciones analizadas en este trabajo, por lo que queda la posibilidad de que porten mutaciones en otra región del gen, o en los otros dos genes involucrados con este tipo de enfermedad.

1

Antecedentes

1.1 DEMENCIA

La demencia es un síndrome complejo, caracterizado por el deterioro de la memoria y el desarrollo de múltiples déficits cognoscitivos^[1-3].

Su causa puede deberse a los efectos fisiológicos directos de una enfermedad, a los efectos tóxicos persistentes de una sustancia o a múltiples etiologías^[2], se estiman aproximadamente 60 causas posibles^[1], está relacionada con lesiones cerebrales de tipo vascular, degenerativo, traumático, tóxico, infeccioso o tumoral, se acompaña de síntomas neurológicos variables, su inicio y su evolución son progresivos, dando lugar a una disminución de la autonomía, modificaciones de la conducta y trastornos de las relaciones con los demás, lo que conduce a una desadaptación social y obliga tarde o temprano a una intervención de los servicios médicos y sociales^[3].

La demencia puede dividirse en varias categorías dependiendo del tipo y de la gravedad, en revisiones recientes se han diferenciado tres grandes apartados etiológicos: Demencias degenerativas primarias, demencias vasculares y demencias sintomáticas o secundarias^[4,5].

Demencias degenerativas primarias: Las demencias incluidas en este tipo, poseen en común una afectación encefálica primaria, se desconoce un agente causal bien establecido, tienen un curso progresivo y se identifican por criterios clínico patológicos, en los últimos años se han realizado importantes avances en el conocimiento de las bases genéticas de varias de éstas demencias, identificándose los genes responsables de algunas de éstas enfermedades, tal es el caso de la enfermedad de Alzheimer, los estudios genéticos en las formas familiares de la enfermedad han permitido establecer que la enfermedad esta ligada a los cromosomas 1, 14 ó 21, sin embargo existe un alto porcentaje de casos esporádicos en los que al igual que otras demencias degenerativas, la etiología debe seguir atribuyéndose a la combinación de factores genéticos y ambientales^[5].

Demencias vasculares: La demencia vascular, es la segunda causa de demencia en la población general, después de la enfermedad de Alzheimer.

La característica histopatológica común consiste en lesiones encefálicas, derivadas de la oclusión o rotura de los vasos que configuran el árbol arterial y venoso cerebral, la etiopatogenia de éstas lesiones es tan variada, en función del tamaño del vaso afectado y la naturaleza de la lesión^[5].

Demencias secundarias: En este tipo de demencias se encuentran enfermedades diversas, que incluyen padecimientos metabólicos, infecciosos, tóxicos, traumáticos^[1,5], y un gran número de causas de etiología conocida y diversa, por lo general son tratables y la mayoría de ellas son reversibles, si su identificación es precoz^[5].

1.2 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo, progresivo e irreversible de la corteza cerebral, considerado el tipo de demencia más común en el adulto mayor, caracterizado por la pérdida de la memoria y el deterioro de las funciones cognitivas del pensamiento y de la conducta^[3,6,7].

Su nombre ha sido dado en reconocimiento al patólogo y psiquiatra alemán Alois Alzheimer (1864-1915), quien en 1907 describió por primera vez este tipo de demencia en una paciente de 51 años llamada " Auguste D ", quien desde hacía más de cinco años presentaba un trastorno caracterizado por la progresiva disminución de la capacidad cognitiva, síntomas de lesiones localizadas, alucinaciones y pérdida de la capacidad de integración social.

A la muerte de Auguste el 8 de abril de 1906, los estudios realizados por Alzheimer en el cerebro de esta paciente, localizaron en la corteza cerebral las alteraciones histopatológicas hoy conocidas como placas seniles y ovillos o marañas neurofibrilares, que ahora dan el fundamento diagnóstico a este tipo de demencia y constituyen los hallazgos característicos de la neuropatología de la enfermedad^[3,5,8].

1.2.1 *Epidemiología*

La enfermedad de Alzheimer representa más del 60% de los casos de demencia reportados en la literatura^[9], la duración media de la enfermedad desde el inicio de los síntomas hasta la muerte, es de ocho a diez años^[2]. La prevalencia se estima en un 2.4% por encima de los 65 años y esta cifra se eleva de un 20 a un 35% en la población mayor de los 85 años de edad, aunque también puede presentarse en personas jóvenes, pero en un porcentaje mucho menor^[6,10-12].

En Estados Unidos la cifra de muertes al año es de más de 100,000 individuos, convirtiendo a la enfermedad en la cuarta causa de muerte entre los adultos^[10], se estima que existen aproximadamente 4 millones de americanos que padecen esta enfermedad^[12,13].

En México se calcula que existen más de 350,000 casos de enfermedad de Alzheimer^[6], y a nivel mundial se estima que para el año 2025, serán de 22 a 25 millones las personas afectadas por la enfermedad^[12,13].

1.2.2 Clasificación

Para su estudio la EA se clasifica de dos formas:

- 1) Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF): Aquella que tiene una influencia genética y puede ser de inicio temprano ó presenil, cuando los síntomas aparecen antes de los 65 años y sigue un patrón de herencia autosómico dominante, en la que se encuentran implicados tres genes principales, el gen de la *Proteína Precursora del β -amiloide (APP)* localizado en el cromosoma 21 y los genes *Presenilina-1 (PS1)* y *Presenilina-2 (PS2)* localizados en los cromosomas 14 y 1 respectivamente, o de inicio tardío o senil, si los síntomas se presentan después de los 65 años^[2,10,14-16].
- 2) Enfermedad de Alzheimer Esporádica: Aquella que no tiene un patrón de herencia definido y puede ser tanto de inicio temprano, como de inicio tardío^[14-16].

Tanto las formas familiares de inicio tardío, como las formas esporádicas, se han asociado a un factor de susceptibilidad, el alelo $\epsilon 4$ del gen de la *Apolipoproteína E (APOE)*, que se ha considerado como un factor de riesgo para la enfermedad^[10,15,17-20].

La mayoría de los casos de EA son esporádicos de inicio tardío, tienen menos influencia hereditaria y están más relacionados al proceso de envejecimiento, mientras que los casos familiares con patrón de herencia autosómico dominante, corresponden solo a un 5-10% del total de enfermos, presentan un deterioro cognoscitivo y las alteraciones histopatológicas de evolución más rápida y mucho más severa^[7,10,14].

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**

De cualquier manera se considera que la mayor parte de los enfermos pertenecen al grupo de inicio tardío sin antecedentes familiares, pero es importante señalar que aunque se desconocen las verdaderas causas de este tipo de enfermedad, se ha demostrado que existen dos factores de riesgo importantes: la edad avanzada y la existencia de antecedentes familiares, de tal manera que la mayor parte de casos de EA que aparecen esporádicamente, pueden deberse a que otros miembros de la familia no viven lo suficiente para manifestar la enfermedad, en el caso de padecerla^[14].

1.2.3 *Características clínicas*

- *Alteraciones de la memoria:* Constituyen el aspecto clínico predominante de la EA, son las primeras manifestaciones que se presentan. Las personas que padecen la enfermedad tienen deteriorada la capacidad para aprender información nueva y la olvidan en los inicios del padecimiento, la dificultad para retener información nueva se va haciendo más notoria^[2,8,9].
- *Afasias:* Alteraciones del lenguaje tanto en su comprensión como en su emisión, pueden estar comprometidos tanto la comprensión del lenguaje hablado y escrito, como la repetición del lenguaje^[2,9]. La dificultad generada por la pérdida de vocabulario obliga al enfermo a utilizar frases largas y vagas (circunloquio), en las fases avanzadas los pacientes pueden enmudecer y presentar un patrón de lenguaje deteriorado caracterizado por ecolalia (repetir lo que oye), palilalia (repetir sonidos o palabras una y otra vez), neologismos (palabra nueva en reemplazo de la adecuada) y logoclonia (repetición de la sílaba final de una palabra)^[2,8].

- **Apraxias:** Deterioro de la capacidad de ejecución de las actividades motoras, a pesar de conservar las habilidades motoras, la función sensorial y la comprensión de la tarea a realizar, se encuentra deteriorada la capacidad en el uso de objetos, así como la actividad constructiva de actos motores conocidos, como por ejemplo movimientos de las manos, para decir adiós etc^[2,3].
- **Agnosias:** Incapacidad de reconocer o identificar objetos, a pesar de tener una función sensorial intacta. El paciente puede tener una agudeza visual normal, pero ha perdido la capacidad para reconocer objetos, es incapaz de reconocer a sus familiares o incluso su propia imagen en el espejo^[2,3].
- **Alteraciones en la capacidad de ejecución:** Implica el deterioro del pensamiento abstracto, para planificar, iniciar, secuenciar, monitorizar y detener un comportamiento complejo, en su incapacidad de abstraer lo común de los objetos aparentemente diferentes o de encontrar la diferencia entre dos objetos aparentemente distintos.
El deterioro del pensamiento abstracto puede manifestarse por la incapacidad para afrontar situaciones nuevas y evitar situaciones que requieren el procesamiento de información nueva y compleja^[2].
- **Otras alteraciones:** En etapas más tardías, el avanzado deterioro cognoscitivo suele asociarse a ansiedad, depresión, trastornos del sueño, alucinaciones, estrés y en algunos casos pueden presentarse convulsiones epilépticas^[2].

1.2.4 Características neurohistopatológicas

La neuropatología de la EA se caracteriza por dos tipos de lesiones principales localizadas en el hipocampo que es el centro de la memoria y en la corteza cerebral que es una zona involucrada en el razonamiento, la memoria y el lenguaje^[12,16,21]. Estas lesiones son: Las placas seniles o depósitos de amiloide, constituidos en su mayoría por el péptido β -amiloide y los ovillos o marañas neurofibrilares formados básicamente de proteína tau, las lesiones se asocian a una importante pérdida sináptica, atrofia cerebral y a la muerte de células neuronales ^[10,11,14,16,22,23].

PLACAS SENILES: También llamadas placas neuríticas o depósitos de amiloide, se localizan en el hipocampo y en el lóbulo temporal de la corteza cerebral, son depósitos extracelulares de restos de axones y neuronas degeneradas unidas a una proteína insoluble llamada β -amiloide formada de 42 a 43 aminoácidos, este péptido es el mayor componente de la placa y se deposita en mayor cantidad en el cerebro de los pacientes afectados por la enfermedad^[10,24].

OVILLOS O MARAÑAS NEUROFIBRILARES: Aparecen más tardíamente durante el curso de la enfermedad, están relacionados con la muerte neuronal, son formaciones anormales localizadas intraneuronalmente constituidos por restos celulares, estructuras proteicas y agregados de proteína tau anormalmente fosforilada que forman filamentos entrelazados en forma helicoidal los cuales precipitan en el interior de la célula causando su muerte^[10,12,14,25].

Tau es una proteína del citoesqueleto constructora de microtúbulos que se extiende de un extremo a otro de la célula nerviosa transportando nutrientes y componentes estructurales, la formación de proteína tau hiperfosforilada altera su función normal y conduce a la desorganización de los microtúbulos y a alteraciones en el transporte axonal, dando lugar a los ovillos o marañas neurofibrilares^[12,25].

Las placas seniles y los ovillos o marañas neurofibrilares se encuentran también durante el envejecimiento normal, se empiezan a desarrollar a partir de los 50 años de edad, pero aparecen en escasa proporción, al contrario de lo que ocurre en los cerebros de pacientes con EA.

En el caso de las placas seniles los depósitos de β -amiloide son aparentemente no neurotóxicos, mientras que en la EA son más abundantes con agregados de β -amiloide altamente concentrados en el centro de la placa, son insolubles y resistentes a la proteólisis^[26].

Los ovillos o marañas neurofibrilares aparecen más tardíamente durante el curso de la EA, se desarrollan en gran cantidad y con una arquitectura desorganizada, su densidad y mayor concentración esta involucrada con la severidad de la demencia^[10,12].

1.2.5 *Etiología*

La etiología inicial de la EA hasta el momento es desconocida, se considera una enfermedad multifactorial, es decir que existen una variedad de factores tanto genéticos como ambientales, que conducen a los cambios neuropatológicos en el cerebro de los pacientes con la enfermedad^[10,27]. Se han establecido ciertas causas en las que se mencionan los aspectos genéticos, la exposición a posibles agentes infecciosos no identificados, o la exposición a tóxicos ambientales^[5], pero la causa, o causas principales de la EA no han sido todavía determinadas^[27].

a) *Patogenia*

El péptido β -amiloide y la proteína tau son los mayores componentes de las placas seniles y los ovillos o marañas neurofibrilares respectivamente, por lo que son las dos proteínas ampliamente implicadas con la patogénesis de la EA^[28]. Sin embargo, según las investigaciones diagnósticas, clínicas y patológicas, se acepta que la acumulación del péptido β -amiloide juega un papel central en la etiopatogenia de la enfermedad, por lo que las investigaciones se han centrado en el estudio de este péptido, para el que se han establecido hipótesis como la de la cascada amiloide que en la actualidad es la que cuenta con más apoyo científico^[21,28,29].

a.1) Producción del péptido β -amiloide

El péptido β -amiloide ($A\beta$), es un producto del metabolismo anormal de una proteína mayor llamada Proteína Precursora del β -amiloide (APP), la cual se expresa en numerosas células^[30] y tejidos del organismo, incluyendo las neuronas, células musculares lisas de la pared vascular y plaquetas^[5]. A pesar del tiempo que se ha llevado estudiar esta proteína, su función biológica en la célula no esta totalmente entendida, se sabe que su expresión se ve aumentada durante fenómenos de estrés celular, se han encontrado funciones importantes en la inhibición de proteasas, la regulación del crecimiento, la adhesión celular, la cascada de la coagulación y el reconocimiento de la superficie celular, aunque se desconocen los mecanismos que inducen su aumento o su relación con el desarrollo de la EA^[6,14]. La APP tiene características estructurales de las proteínas de membrana, se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso, pasa por el aparato de Golgi donde se glicosila y se empaqueta en vesículas de transporte, atraviesa el citoplasma y finalmente se inserta en la membrana celular en donde puede seguir dos vías metabólicas^[5,26,30], que compiten por la misma parte de la proteína. En lo que es la vía más común, una proteasa conocida como α -secretasa realiza una escisión en la APP produciendo un fragmento amino-terminal largo y soluble ($APP_{s,u}$) y un fragmento carboxi-terminal de 10 KD llamado C83, el cual permanece unido a la membrana^[30] para posteriormente ser procesado por γ -secretasa. El resultado de esta nueva escisión es un péptido no dañino con un PM de 3 KD denominado P3^[26,30], este proceso es conocido como *vía no amiloidogénica* puesto que la acción de α -secretasa previene la formación del péptido $A\beta$ con lo que se impide la formación de los depósitos^[14,30,31](Fig 1a).

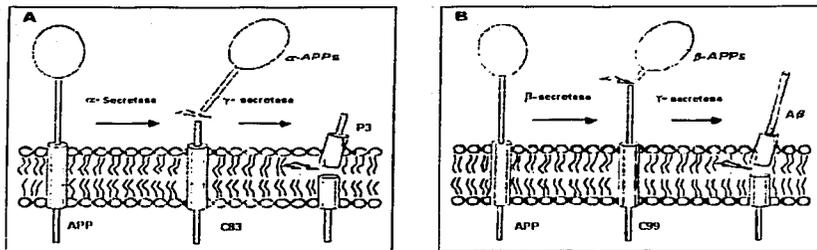


Figura 1. a) vía no amiloidogénica y b) vía amiloidogénica en el procesamiento de la APP^[23].

En la otra vía una proteasa conocida como β -secretasa, corta a la APP liberando un fragmento N-terminal soluble de 100 KD (APP_{sN})^[30] y un fragmento Carboxi-terminal de aproximadamente 12 KD llamado C99 que también queda unido a la membrana y tras ser procesado por γ -secretasa, genera el péptido $A\beta$, el cual tiene un PM de 4KD^[26,30], esta vía es conocida como *vía amiloidogénica*, debido a que la acción de β y γ secretasas inducen a la formación del péptido $A\beta$ (Fig 1b), este péptido puede producirse de dos formas diferentes, de 40 y de 42 o 43 aminoácidos^[14,30,31], en condiciones normales la forma más común relativamente soluble contiene 40 aminoácidos, mientras que sólo cerca del 10% tienen una longitud de 42 o 43 aminoácidos^[12,26], su acumulación en el cerebro es una característica de la patogénesis de la EA^[32], según las investigaciones la sobreproducción del péptido $A\beta$ de 42 o 43 aminoácidos es la causa de la EA^[26,30], ya que es mucho más insoluble, por lo que forma autoagregados que constituyen las fibrillas insolubles que se encuentran en los depósitos amiloides y tiene un efecto neurotóxico directo sobre las neuronas^[12,14,26,28].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a.2) Hipótesis de la cascada amiloide

El mecanismo por el cual el β -amiloide de 42 aminoácidos daña a las neuronas, no se conoce con certeza. Existe evidencia de que al producirse el daño neuronal se genera un proceso inflamatorio que parece estar relacionado con una variedad de procesos, entre ellos la formación de radicales libres, la obstrucción de la membrana mitocondrial, alteraciones en la homeostasis del calcio y el estrés oxidativo que conduce a activar los procesos de apoptosis celular, induciendo a la muerte neuronal^[12,27,33].

Según la hipótesis de la cascada amiloide, la producción excesiva del péptido A β de 42 o 43 aminoácidos conduce a la formación de depósitos extracelulares de sustancia amiloide en forma de placas seniles, estos depósitos resultan tóxicos para las células que entran en contacto con ellos y desencadenan una serie de reacciones que alteran el funcionamiento normal de la proteína tau, llevando a la desestructuración de los microtúbulos, a la formación de ovillos neurofibrilares y posteriormente a la muerte celular y a la manifestación de la enfermedad^[12,14,21,26] (Fig 2).

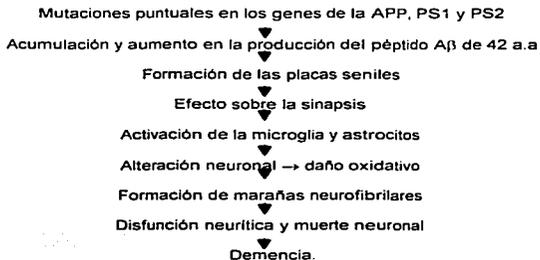


Figura 2. Hipótesis de la cascada amiloide^[21].

Una de las razones que sustentan esta hipótesis es la observación de que el aumento en la concentración del péptido A β y sus depósitos en el cerebro, en forma de placas seniles, además de ser de las primeras lesiones que aparecen en la enfermedad, son causadas por mutaciones en los genes que codifican para la APP, PS1 y PS2 y sin embargo las mutaciones en el gen que codifica la proteína tau causan un desorden conocido como demencia fronto temporal con parkinsonismo, caracterizado por varios depósitos de marañas neurofibrilares en el cerebro, pero no causan depósitos de A β ^[21-23], es importante señalar, que si la hipótesis que postula un papel central para el péptido amiloide es cierta, la única correlación establecida inequívoca entre la enfermedad y las lesiones patológicas se da con los ovillos neurofibrilares, un mayor número de lesiones neurofibrilares corresponden a un mayor grado de demencia, mientras que no existe una correlación tan clara con la aparición de los depósitos extracelulares^[14].

La hipótesis de la cascada amiloide no explica el verdadero origen de la enfermedad, puesto que no ofrece ninguna explicación de los mecanismos que pueden producir el aumento en la producción del A β y posteriormente como se llega a la muerte neuronal, excepto en los casos genéticos con mutaciones en la APP, PS1 y PS2^[14,21].

Esta teoría es la más aceptada, fue propuesta a principios de los 90's y se ha mantenido hasta hoy posiblemente a falta de otras alternativas mas convincentes^[14].

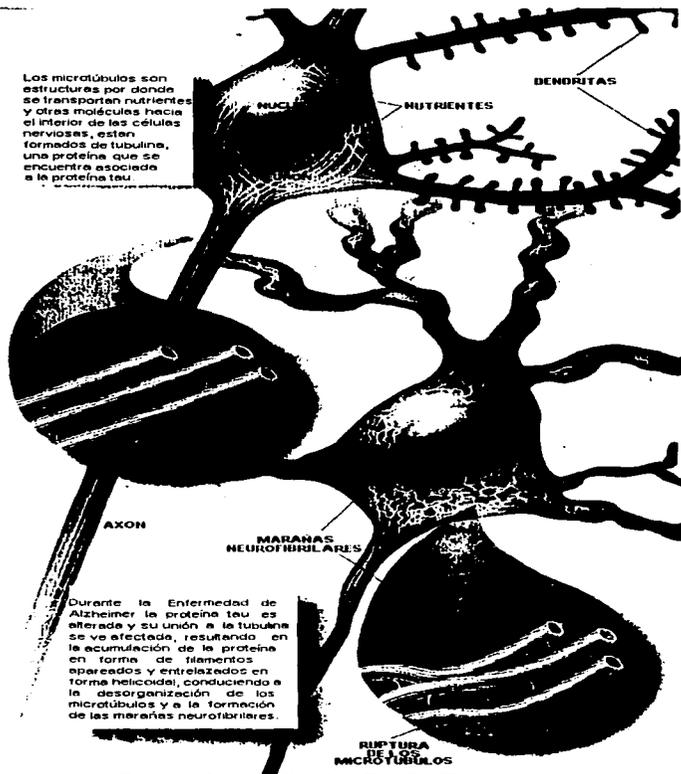
a.3) Mecanismo patogénico de la proteína tau en la EA

Otra posible explicación de la patología de la EA, son las alteraciones producidas por la proteína tau, ya que el hecho de que la hipótesis dominante centre el debate sobre el péptido A β , no significa que los ovillos neurofibrilares carezcan de importancia en el proceso patológico, pues se sabe que la severidad de la demencia se relaciona con la extensión de la degeneración neurofibrilar y no con el número de placas seniles presentes^[12,14].

En el humano la proteína tau se codifica por un gen localizado en el cromosoma 17, es una de las principales proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) presentes en las células neuronales. La función específica de tau al igual que otros tipos de MAPs, es promover el ensamble y estabilidad de los microtúbulos que componen el citoesqueleto axonal, facilita la polimerización de la tubulina en la célula, de manera que se formen los microtúbulos que le dan su forma, los microtúbulos son estructuras por donde circulan los nutrientes y moléculas, desde el centro celular hasta los axones de las neuronas, tau facilita este transporte de las diferentes vesículas a nivel intracelular.

En los ovillos o marañas neurofibrilares la agregación de tau se produce debido a que ésta sufre una fosforilación irreversible que impide su función normal, a la vez que facilita su autoagregación en fibrillas, la proteína se encuentra anormalmente fosforilada y no puede ligarse a la tubulina que forma los microtúbulos por lo tanto no puede cumplir con su función normal llevando a la desorganización de los microtúbulos y más tarde a la muerte neuronal^[6,12,14,34], (Fig 3).

Los microtúbulos son estructuras por donde se transportan nutrientes y otras moléculas hacia el interior de las células nerviosas, están formados de tubulina, una proteína que se encuentra asociada a la proteína tau.



Durante la Enfermedad de Alzheimer la proteína tau es alterada y su unión a la tubulina se ve afectada, resultando en la acumulación de la proteína en forma de filamentos apilados y entrelazados en forma helicoidal, conduciendo a la desorganización de los microtúbulos y a la formación de las marañas neurofibrilares.

Figura 3. Asociación entre la proteína tau y las marañas neurofibrilares^[12].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b) Genética de la enfermedad de Alzheimer

La mayoría de los casos de EA son esporádicos, pero se han identificado familias con EA de inicio temprano (<65 años), las cuales siguen un patrón de herencia autosómico dominante, estos casos son relativamente raros y a nivel mundial han sido identificadas cerca de 120 familias portadoras de mutaciones causantes de esta enfermedad, que representan solo el 5% de todos los casos de EA^[9,35,36].

Los estudios genéticos realizados en miembros de diferentes familias afectadas por la EA familiar de inicio temprano, han identificado a tres genes como los responsables de la enfermedad: El gen para la *Proteína Precursora del β -Amiloide* localizado en el cromosoma 21^[7,17,37-39], para el que han sido descritas cerca de 8 mutaciones en aproximadamente 25 familias a nivel mundial^[10,36], el gen para la *Presenilina-1* en el cromosoma 14 con más de 50 mutaciones reportadas y responsable de más del 70% de los casos de EAF de inicio temprano y el gen de la *Presenilina-2* localizado en el cromosoma 1, cuyas mutaciones son menos frecuentes, en el que han sido localizadas solo 2 mutaciones^[7,18,35-40].

Las mutaciones en cualquiera de los tres genes, resultan en el aumento de la producción del péptido A β de 42 aminoácidos que se deposita en mayor cantidad en el cerebro de los pacientes con EA y es una de las características primarias de la enfermedad ^[21,22,24].

b.1) Proteína Precursora Amiloide

El primer gen identificado como susceptible para la EA fue el gen de la APP, quien se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 21q21.2 y codifica una proteína entre 695 y 770 aminoácidos con un peso molecular de 90-100 KD^[7,12,41], esto surgió del hecho de que las personas afectadas por el Síndrome de Down o trisomía 21, las cuales tienen una copia adicional de gen APP, presentan lesiones cerebrales idénticas a las de los pacientes con EA cuando viven más allá de los 40 años, esto permitió asociar las mutaciones en la APP con el desarrollo de la

enfermedad^[37], y fue en 1991 cuando se demostró que las mutaciones en este gen son las causantes de aproximadamente 5-10% de los casos de EAF, en un reducido número de familias^[7,14,18,42,43].

La primera mutación identificada en el gen de la APP fue la mutación Holandesa (*Dutch*) Glu693Gln^[36], en la que el cambio del aminoácido glutamato por glutamina en la posición 693 de la APP, causa una hemorragia cerebral con angiopatía hereditaria, resultando en depósitos masivos de A β en los vasos sanguíneos, induciendo a la muerte cerebral por parálisis y posteriormente, a la muerte^[29,36].

En los siguientes años otras mutaciones fueron localizadas en los exones 16 y 17 en diferentes familias con EAF^[41]. La mutación Sueca (*swedish*) 670/671, que es una doble mutación en la cual cambia el aminoácido lisina por asparagina y metionina por leucina^[36], la mutación llamada flamenca (*flemish*) en el codón 692 (Ala692Gly), mutación que afecta la actividad de γ -secretasa que resulta en un aumento de la secreción del péptido A β y las mutaciones en los codones 716 y 717^[36,41].

Las mutación *sueca* en los codones 670/671 y la mutación *flamenca* en el 692 son muy raras, las más frecuentes son las descritas en los codones 717, que han sido identificadas en unas 20 familias de diferentes orígenes étnicos, entre los que se incluyen italianos y japoneses^[31,41].

Todas las mutaciones reportadas en el gen de la APP, son mutaciones puntuales y se localizan en, o dentro de la secuencia del A β ^[7,41], involucran los sitios en donde se lleva acabo el procesamiento de la APP por α , β y secretasas^[29,31].

Tabla 1. Mutaciones puntuales en el gen de la APP humana^[31,36].

Codón	Mutación
665	Gln → Asp
670/671	Lis-Met → Ans-Leu
673	Ala → Thr
692	Ala → Gly
693	Glu → Gly
	Glu → Gln
713	Ala → Val
715	Ala → Thr
716	Ile → Val
717	Val → Ile
	Val → Phe
	Val → Gly

b.2) Presenilina-1

La mayoría de los casos de EA con herencia autosómica dominante son causados por mutaciones en el gen de la PS1 localizado en el cromosoma 14q24.3^[7,18,39,40,44-46], estas mutaciones son responsables de hasta un 70% de todos los casos de EA de inicio temprano^[7,16,44], hasta el momento han sido identificadas más de 50 mutaciones puntuales en 82 familias de diferentes orígenes étnicos a nivel mundial^[7,20,36,38] con una edad de inicio que va desde 25 años (Leu392Val), hasta 64 años (Ala79Val), la razón para esta variación aún es desconocida, al parecer los sitios más susceptibles para mutaciones patogénicas en PS1 son las regiones del exón 5 y los residuos 260 y 290 que codifican para el exón 8, en los cuales se ha estimado se localiza el 65% de todas las mutaciones^[36,41].

Sin embargo las mutaciones en PS1 no parecen localizarse en áreas determinadas de la proteína, se encuentran distribuidas a lo largo de la misma, lo que indica la importancia que para la función de PS1 tiene su integridad estructural^[47].

Todas las mutaciones en PS1 ocurren en sitios altamente conservados con PS2, a excepción de Glu123Lys^[40], la mayor parte de éstas mutaciones son puntuales y provocan un cambio en la estructura primaria de la proteína, a excepción de la mutación conocida como delección $\Delta 9$ en el dominio HLV^[14,18,36,48].

La delección $\Delta 9$ se ha descrito en familias de origen inglés, japonés, australiano y finlandés, esta mutación se caracteriza por la eliminación del exón 9 de la proteína, sin modificar el marco de lectura, lo que produce la eliminación del sitio de procesamiento (splicing) y por lo tanto la eliminación de los fragmentos correspondientes, una característica notable de esta mutación es la aparición en casi todas las familias, de paraparesia espástica, un fenotipo que no parece darse con ninguna otra mutación^[14]. Hasta el momento solo una mutación no patogénica ha sido reportada para PS1 en el codón 318 (Glu318Gly), que es un polimorfismo raro en una región del gen relacionada con la EA^[18,31,35,38,40].

Tabla 2. Mutaciones puntuales en el gen de PS1 humana^[36,40]

Codón	Mutación	Fenotipo
79	Ala → Val	EHF, inicio 64 años
82	Val → Leu	EHF, inicio 55 años
96	Val → Phe	EHF, N.R
115	Tyr → His	EHF, inicio 37 años
115	Tyr → Cys	EHF, N.R
117	Pro → Leu	EHF, N.R
120	Glu → Asp	EHF, inicio 48 años
120	Glu → Lys	EHF, N.R
123	Lys → Glu	EHF, N.R
135	Ans → Asp	EHF, N.R
139	Met → Thr	EHF, inicio 49 años
139	Met → Val	EHF, inicio 40 años
139	Met → Lys	EHF, N.R
143	Ile → Phe	EHF, N.R
143	Ile → Thr	EHF, inicio 35 años
146	Met → Leu	EHF, inicio 45 años
146	Met → Val	EHF, inicio 38 años
146	Met → Ile	EHF, inicio 40 años
163	His → Arg	EHF, inicio 50 años
163	His → Tyr	EHF, inicio 47 años
171	Leu → Pro	EHF, inicio 40 años
209	Gly → Val	EHF, N.R
213	Ile → Thr	EHF, N.R
231	Ala → Thr	EHF, inicio 52 años
231	Ala → Val	EHF, N.R
233	Met → Thr	EHF, inicio 35 años
235	Leu → Pro	EHF, inicio 32 años
246	Ala → Glu	EHF, inicio 55 años
250	Leu → Ser	EHF, N.R
260	Ala → Val	EHF, inicio 40 años
262	Leu → Phe	EHF, inicio 50 años
263	Cys → Arg	EHF, inicio 47 años
264	Pro → Leu	EHF, inicio 45 años
267	Pro → Ser	EHF, inicio 35 años
269	Arg → Gly	EHF, N.R
269	Arg → His	EHF, N.R
273	Glu → Ala	EHF, N.R
276	Arg → Thr	EHF, N.R
280	Glu → Ala	EHF, inicio 47 años
280	Glu → Gly	EHF, inicio 42 años
282	Leu → Arg	EHF, N.R
285	Ala → Val	EHF, inicio 50 años
286	Leu → Val	EHF, inicio 50 años
291-319	Delección	EHF, N.R
317	Glu → Gly	EHF, N.R
384	Gly → Ala	EHF, inicio 35 años
392	Leu → val	EHF, inicio 25-40 años
410	Cys → Tyr	EHF, inicio 48 años
426	Ala → Pro	EHF, N.R
436	Pro → Ser	EHF, N.R

NR = No reportada

b.3) Presenilina-2

Poco después del descubrimiento de PS1, se identificó un tercer gen, el cual mostró homología con PS1, el nuevo gen fue mapeado en el cromosoma 1q42.1^[7,18,40] e inicialmente se le dio el nombre de STM2, pero debido a que presenta una homología del 67% con PS1 tanto a nivel de secuencia de aminoácidos, como a nivel estructural, se le asignó el nombre de PS2, ambos genes están constituido por 12 exones y codifican para proteínas que poseen entre seis y ocho dominios transmembranales^[10,16-18,45], el gen de PS2 codifica un producto de 448 aminoácidos^[10,18,45].

La homología entre PS1 y PS2 se centra especialmente en los dominios transmembranales, con menor grado de homología en el dominio amino terminal, así como en los dominios situados entre los exones 8 y 10, que son los sitios en donde se piensa reside la especificidad funcional de cada proteína^[14,40].

Entre las funciones que se han descrito para PS2, esta la de aumentar la sensibilidad para inducir la apoptosis, pero esto es algo que debe ser comprobado con estudios posteriores^[40], la proteína es localizada en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, se expresa en músculo cardíaco, músculo esquelético y páncreas^[14,43], su relación con PS1 permanece aún desconocida, pero las mutaciones en ambos genes causan la EAF, mediante el mismo mecanismo que la APP, aumentando la concentración del péptido A β ^[14,24,40].

Los análisis genéticos en PS2 han descubierto 2 diferentes mutaciones las cuales se presentan en una edad que varía entre 40 y 85 años de edad, la primera mutación fue descubierta en una población de familias del Volga con ancestros alemanes^[7,10,29,40] y fue identificada como (Ans141Ile) o Ans-135 en PS1, la segunda fue (Met239Val) o Met-233 en PS1 y fue descrita en una familia italiana^[10,40], sin embargo el número de mutaciones descritas en PS2 representa menos del 1% de todas las mutaciones reportadas en la EAF de inicio temprano^[18] y aunque éstas sean mucho menores que las reportadas para PS1, es importante señalar que todas las mutaciones ya sean en PS1 o en PS2 afectan residuos que son altamente

conservados entre las dos proteínas y también se conservan en diferentes especies animales, desde el ratón hasta el nemátodo *Caenorhabditis elegans*^[45].

Tabla 3. Mutaciones puntuales en el gen de PS2 humana^[36].

Codón	Mutación	Fenotipo
141	Ans → Ile	EAF(Germanos del Volga), inicio de 50-65 años.
239	Met → Val	EAF(Florenzia) inicio variable.

c) Factores de riesgo asociados a la enfermedad de Alzheimer

c.1) Factores de riesgo genéticos

Además de los genes APP, PS1 y PS2 cuyas mutaciones desencadenan una EAF de inicio temprano transmitida con una herencia autosómica dominante, existen otros factores de riesgo genéticos relacionados con el desarrollo de la EA, el más importante de todos es el gen para la *Apolipoproteína E*, cuyo alelo ε4 está ligado a una susceptibilidad para padecer la EA de inicio tardío, tanto familiar como esporádica^[5]. En los últimos años nuevos locus relacionados con la EA de inicio tardío parecen haber sido identificados en otros cromosomas, pero su localización exacta todavía no ha sido establecida con certeza^[14,36].

c.1.1) Apolipoproteína E

El primer gen asociado a las formas tardías de la EA, tanto familiar como esporádica fue el gen para la *Apolipoproteína E*, identificado en el cromosoma 19q13.2^[5,14,41], el gen consta de 4 exones y codifica una proteína de 299 aminoácidos, con un peso molecular de 34 KD^[41], sintetizada principalmente en el hígado y en el cerebro, su función principal es el transporte y redistribución de colesterol entre las diversas células del organismo, también esta involucrada en la reparación y regeneración del tejido nervioso^[12,41].

El gen de *ApoE* puede encontrarse en 3 alelos diferentes denominados, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ ^[41,49], los cuales producen 6 diferentes genotipos, tres homocigotos: *ApoE* 2/2, 3/3, 4/4 y tres heterocigotos: *ApoE* 2/3, 2/4, 4/3, la frecuencia de cada uno varía entre las diferentes poblaciones^[41].

El alelo $\epsilon 3$ es el más común, se presenta de un 40-90% de la población en general, $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$, son menos comunes, se expresan en un 2 a 37% respectivamente^[12], la relación entre la *ApoE* y la EA se establece mediante la expresión del alelo $\epsilon 4$ ^[14,50,51], ya que aquellos individuos que poseen una o dos copias de este alelo presentan un riesgo de padecer la enfermedad de 3 a 8 veces más que individuos que no poseen ninguna copia^[14,49], al mismo tiempo que existen pacientes que no portan ninguna copia del alelo $\epsilon 4$ y también desarrollan la enfermedad^[10], de modo que no todos los que portan dicho alelo pueden manifestarla, por lo que la heredabilidad del alelo $\epsilon 4$, ha sido considerado como un factor de riesgo que se estima en un 40 a 50 % de todos los casos de EA esporádicos y familiares de inicio tardío^[10,12].

Se ha observado que, a mayor número de alelos $\epsilon 4$, corresponden a una edad de inicio más temprano de la EA, también se ha identificado una mayor cantidad de depósitos A β en pacientes con EA y Síndrome de Down portadores del alelo $\epsilon 4$, en comparación con los que no lo portan^[10,41,50].

Aunque es menos frecuente, el genotipo $\epsilon 4$ de ApoE, puede aparecer también en pacientes con EAF de inicio temprano portadoras de mutaciones en la APP, pero no en pacientes con mutaciones en PS1, esto sugiere que hay diferencias en la patogénesis de la enfermedad, aunque las mutaciones de ambos genes resulten en el aumento de la concentración del péptido A β .

El papel de ApoE en la EA no parece ser claro aún, pero la proteína puede ser localizada en las placas seniles y en las marañas neurofibrilares, además se encuentra unida al péptido A β en el líquido céfalorraquídeo^[10], se sabe que la transcripción del gen se ve aumentada en respuesta al estrés producido en las células, posiblemente para mediar la recuperación del colesterol liberado por las células que mueren^[14].

Se ha mencionado que la expresión de los diferentes alelos de ApoE, producen diferentes efectos en los depósitos del péptido A β , otros mencionan que tienen una alta afinidad por el péptido, y algunos otros autores han mencionado que $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ previenen la agregación y la formación de marañas neurofibrilares teniendo un efecto protector antioxidante del A β y que el alelo $\epsilon 4$ tiene una actividad antioxidante menor, en comparación con los otros alelos^[10,52].

Otra posibilidad ha sido mencionada por otros investigadores, que han observado que ApoE con alelo $\epsilon 4$ compete con el A β , para unirse a una molécula que transporta materiales hacia el espacio intercelular, esta molécula parece tener más afinidad por APOE $\epsilon 4$ que por el A β , aumentando de esta manera la concentración del péptido, esto se observa en portadores del alelo $\epsilon 4$, que tienen más acumulación de A β , que en aquellos que portan los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 3$ ^[12], sin embargo el mecanismo por el que la expresión del alelo $\epsilon 4$ de ApoE aumenta el riesgo de desarrollar la EA, no esta completamente entendido^[10].

c.1.2) Otros genes

Hasta el momento hay una lista de nuevos genes identificados como factores de susceptibilidad para la EA, entre los que se encuentran dos locus en el cromosoma 12 que podrían estar relacionados con la enfermedad, uno es el receptor similar al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) y el otro el α 2- macroglobulina (α -2M), ambos genes se encuentran asociados a las placas seniles^[14,41] y tienen un papel en la degradación del péptido $A\beta$, el LRP es un receptor que reconoce la ApoE y ayuda a su internalización, al igual que reconoce a la APP y también a la α -2M, es una molécula capaz de integrar en una misma vía al precursor del péptido $A\beta$, la ApoE y la α -2M de manera que podría intervenir en la producción del péptido amiloide, diversos estudios han asociado a la enfermedad con marcadores localizados cerca del gen del LRP, de una manera similar a lo observado con la ApoE, aunque con un riesgo mucho menor, pero también existen estudios discrepantes en los que no se ha encontrado ninguna asociación entre este gen y la enfermedad, lo que indica que el papel del LRP en la EA es muy reducido^[14,41,49,53,54].

En lo que respecta a la α -2M, es una proteasa inhibidora que abunda en el suero y es el mejor ligando de las lipoproteínas de baja densidad^[54], en un diseño epidemiológico se comprobó que existe una asociación entre el genotipo de la α -2M y la cantidad de depósitos amiloides que aparecen en el cerebro, de una manera similar a lo que sucede con ApoE, este efecto aparece más marcado en los casos que carecen del alelo ϵ 4, mientras que en los que si lo poseen, no se observa un efecto claro^[14,53,54].

Se han identificado otros locus que incluyen polimorfismos en los genes que codifican para el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-R), localizado en el telómero del brazo corto del cromosoma 9^[41,53], la α -quimi tripsina, la butirilcolinesterasa, bleomicin hidroxilasa, N-acetiltransferasa^[31,41], el gen que codifica una enzima que degrada la insulina(IDE), identificada en una región del brazo largo del cromosoma 10q23-25, la cual se piensa que también esta involucrada

en la degradación del A β ^[53,55-57] y un polimorfismo en el gen de PS1 que es el único que se ha asociado a la EA de inicio tardío^[41].

En varios estudios, todos estos genes han sido relacionados con la EA de inicio tardío^[53], sin embargo la mayoría de éstos, solo son candidatos, pues aún no esta completamente confirmada su relación con la EA, como en el caso de APOE ϵ 4 que es el más estudiado y esta ampliamente determinado como factor de riesgo para desarrollar la enfermedad^[31,41].

c.2) Factores de riesgo establecidos

Edad: Es el factor de riesgo más importante en la EA, se ha observado que el incremento de las placas seniles y las marañas neurofibrilares aumenta con la edad, pero no se hace evidente hasta pasados los 70 años^[4,10].

Historia familiar: Los familiares de primer grado de enfermos con EA muestran una más alta incidencia de demencia, en diversos estudios epidemiológicos se indica que un 50 a 60% de los casos de EA serían esporádicos, pero en muchos de estos casos los parientes de los afectados han fallecido antes de que pudiera expresarse la demencia^[4,9], por lo que el riesgo de padecer EA en un sujeto que tiene un familiar de primer grado afectado con demencia de inicio tardío es de 2 a 3 veces más que el que le corresponde según su edad^[5,10].

Síndrome de Down: Las personas que padecen Trisomía 21 en edades medias de su vida, expresan caracteres clínicos y sobre todo patológicos de la EA, algunos estudios mencionan una mayor prevalencia de Síndrome de Down en familiares de pacientes con EA^[5,12].

c.3) Factores de riesgo probables

Sexo femenino y deficiencia de estrógenos: Los estudios realizados al respecto indican que los índices de demencia son mucho más altos en mujeres que en hombres^[4,10,19], esto es causado probablemente por la mayor supervivencia de las mujeres, en la mayoría de los reportes de incidencia este dato se reproduce en todos los grupos de edad^[19].

Existe mayor consistencia en la capacidad protectora de los estrógenos en las mujeres menopáusicas, según datos reportados, las mujeres tratadas con estrógenos en la menopausia desarrollaron menos EA que las no tratadas y se observa una asociación protectora en función de la dosis de estrógeno recibida.

Los estrógenos entre otras acciones en el SNC ejercen influencia sobre enzimas colinérgicas y el factor de crecimiento nervioso en el hipocampo, pueden tener un efecto modulador de la memoria y modifican los procesos de oxidación^[5].

Trauma craneal: Los datos más recientes demuestran que la demencia senil es de 2 a 6 veces más frecuente en sujetos con traumatismo craneal, en algunos otros estudios solo se ha encontrado esta asociación con la EA en los casos con trauma craneal grave y que sean portadores del alelo $\epsilon 4$ del gen de la ApoE, se piensa que el trauma craneal podría dañar la barrera hematoencefálica (BHE) facilitando el paso de una hipotética respuesta autoinmune al cerebro, o dañar directamente glía o neuronas y también incrementar la expresión cerebral del péptido A β .

No existe suficiente evidencia de que el traumatismo craneal sea relevante desde un punto de vista etiopatogénico en la EA, aunque podría contribuir a acelerar la muerte neuronal y generar una disrupción de la BHE^[4,5].

Factor de riesgo vascular: Se considera importante debido a que se ha demostrado que la hipertensión crónica y la diabetes se asocian con el deterioro cognitivo en el anciano^[5].

Terapia con fármacos anti-inflamatorios: Se ha observado una relación inversa entre la administración crónica de fármacos antiinflamatorios, tanto esteroideos como no esteroideos y la EA, ambos tipos de fármacos han demostrado tener eficacia protectora contra la EA. Esta hipótesis podría ser sustentada puesto que por los trabajos realizados se sabe que la EA se asocia con fenómenos agudos y crónicos de inflamación, como parte de la fisiopatología de la enfermedad^[5].

Nivel educativo: Existe la hipótesis de que el bajo nivel educativo puede ser un factor asociado a la enfermedad por lo tanto un elevado nivel educativo tendría un efecto protector de la EA debido a que los cerebros de las personas que ejercitan mucho la mente, tienen mayor reserva funcional, los estudios realizados al respecto divergen mucho, pues en algunos resultados no se ha evidenciado asociación alguna entre el nivel cultural y la incidencia de EA^[5,9,10].

c.4) Otros posibles factores de riesgo

Raza: En algunos estudios se observa mayor frecuencia de demencia en negros que en blancos y en judíos nacidos en Europa o en América, que en judíos nacidos en África o en Asia. En general los asiáticos presentan menos casos de EA que las razas caucásicas, sin embargo en estudios necrópsicos la frecuencia de demencia es mayor en los blancos(46%) que en los negros (18.2%)^[4].

Exposición a aluminio: Factores neurotóxicos como el aluminio, metales pesados y disolventes orgánicos han sido considerados como factores de riesgo en la EA. En estudios realizados con diferentes metales, se ha encontrado que solo el aluminio se ve aumentado en comparación con cerebros sanos^[4], datos experimentales indican que el aluminio puede aumentar los depósitos de Aβ. Existe una amplia literatura sobre este tema, pero aún no está totalmente comprobado que pudiera tener un papel etiológico en la EA^[5].

Alcoholismo: No existen datos clínicos que evidencien que el alcohol es un factor de riesgo en la EA, pero sí hay algunos datos de estudios patológicos, el alcoholismo crónico grave en el diagnóstico de EA podría confundirse con una demencia secundaria. En otro estudio se encontró una capacidad protectora a la ingesta moderada de alcohol, pero se requiere de más estudios para poder confirmar dicha posibilidad^[5,10].

Dieta: En los estudios que analizan dietas y riesgos de demencia, se ha encontrado atrofia cerebral grave en personas sometidas a largos periodos de ayuno, se ha propuesto que la dieta influye en la función del SNC, ya que la exposición a cobalto, magnesio y hierro promueve la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales pueden ser atrapados por la vitamina E y el selenio.

Otros estudios señalan que personas vegetarianas y consumidoras de pescado tienen menos riesgo de demencia, pero todavía no existen datos consistentes al respecto^[4,5,10].

Tabaco: Algunos estudios han reportado que el tabaco puede disminuir el riesgo de EA, para explicar esta asociación se han formulado diversas hipótesis: la existencia de una disfunción en el receptor nicotínico debido a la falta de un factor endógeno que dificultaría el ligamiento de nicotina y la existencia de un mecanismo genético o adquirido de susceptibilidad al tabaco que protegería frente a la EA, por otro lado se sabe que la nicotina puede mejorar la memoria en animales de experimentación y en el hombre^[4,5].

c.5) Heterogeneidad de la Enfermedad de Alzheimer

El resultado de la heterogeneidad de la EA es aún debatida, se ha sugerido que puede depender de la edad de inicio, la duración de la enfermedad, el curso clínico, el tipo y patrón de síntomas psiquiátricos y neurológicos, sin embargo no está claro si la EA es un síndrome complejo con muchos subtipos y variedades, o varias enfermedades diferentes que fenotípicamente presentan grupos de síntomas similares^[41].

1.3 PRESENILINA-1

1.3.1 Estructura y localización del gen

Poco después del descubrimiento de mutaciones en el gen de la APP, fue identificado un nuevo locus en el cromosoma 14, el descubrimiento del gen se produjo en el año de 1995 por Rudy Tanzi y Peter St George-Hyslop, mediante técnicas de clonaje posicional^[14].

El gen fue identificado en el cromosoma 14q24.3^[7,18,40,44](Fig 4), e inicialmente se le dió el nombre de S182, derivado del nombre del clon estudiado^[14,17,44], posteriormente se le llamo *Presenilina-1* (PS1), puesto que es responsable de la forma precoz o presenil de la EA^[14,27].

La organización estructural del gen de PS1, esta constituido por 12 exones^[58], de los cuales los dos primeros son regiones 5' no traducibles^[10,18,58], de manera que la proteína esta codificada por los exones del 3 al 12 y resulta en un producto de 467 aminoácidos^[10,18](Fig5).

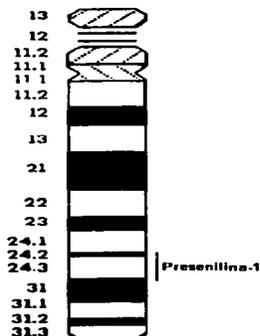


Figura 4. Estructura y localización del gen PS1 en el cromosoma 14q24.3^[5].

MTELPAPLSY	¹⁰	FQNAQMSEDN	²⁰	HLSNTRVRSQN	³⁰	DNRERQEHNQ	⁴⁰	RRSLGHPEPL	⁵⁰
SNGRPQGNRSR	⁶⁰	QWVEQDEEED	⁷⁰	EELTLKYGAK	⁸⁰	HVIMLFVPT	⁹⁰	LCMVVVVATI	¹⁰⁰
KSVSFYTRKD	¹¹⁰	GQLIYTPFTE	¹²⁰	DTETVGQRAL	¹³⁰	HSILNAAIMI	¹⁴⁰	SVIVVMTILL	¹⁵⁰
VVLYKYRCYK	¹⁶⁰	VIHAWLISS	¹⁷⁰	LLLLFFFSFI	¹⁸⁰	YLGVEVFKYN	¹⁹⁰	VAVDYITVAL	²⁰⁰
LIWNLGVVGM	²¹⁰	ISIHWKGPLR	²²⁰	LQQAYLIMIS	²³⁰	ALMALVFIKY	²⁴⁰	LPEWTAWLIL	²⁵⁰
AVISVYDLVA	²⁶⁰	VLCPKGPLRM	²⁷⁰	LVETAQERNE	²⁸⁰	TLFPALIYSS	²⁹⁰	TMWVLVNMAL	³⁰⁰
GDPEAQRVRS	³¹⁰	KNSKYNAEST	³²⁰	ERESQDTVAE	³³⁰	NDDGGFSEEW	³⁴⁰	EAQRDSHLGP	³⁵⁰
HRSTPESRAA	³⁶⁰	VQELSSSILA	³⁷⁰	GEDPEERGVK	³⁸⁰	LG LGDFIFYS	³⁹⁰	VLVGKASATA	⁴⁰⁰
SGDWNTTIAC	⁴¹⁰	FVAILGLCL	⁴²⁰	TLLLLAIFKK	⁴³⁰	ALPALPISIT	⁴⁴⁰	FGLVYFATD	⁴⁵⁰
				⁴⁶⁰	⁴⁶⁷				
				YLVQPFMDQL	AFHQFYI				

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína PS1^[40].

1.3.2 Estructura y topología de la membrana

El análisis de la hidropatía de PS1, indica la presencia de su extremo amino terminal hidrofílico, seguida de 10 regiones hidrofóbicas (HR), de por lo menos 15 aminoácidos de longitud, las cuales pueden potencialmente atravesar la membrana. Todos estos segmentos están conectados por pequeñas asas hidrofílicas (HL), a excepción de un segmento largo que tiene la mayor parte de residuos hidrofílicos entre HR7 y HR8, esta región es denominada la asa grande o larga de PS1^[36,40].

Se han realizado diversos estudios con la finalidad de determinar el número de dominios transmembranales, así como la orientación de los extremos amino y carboxi-terminal de PS1 humana o de su homólogo Sel-12 en *Caenorhabditis elegans*, la mayoría de los modelos propuestos hasta el momento coinciden en que la estructura de PS1 cuenta con un número que varía entre seis y ocho dominios transmembranales(TM)^[17,36], aunque en otros estudios muy interesantes han llegado a demostrar que la estructura más probable contiene ocho dominios transmembranales^[17,47], con sus extremos amino y carboxi-terminal orientados hacia el citosol, en este modelo HR7 y HR8 no atraviesan la membrana pero sí se encuentran asociados a ella^[36], (Fig. 6)

Sin embargo las topologías alternativas no pueden ser totalmente excluidas, existen reportes de que PS1 puede interactuar con la APP y cuando esto ocurre muestra una alteración topológica con una translocación del extremo amino-terminal hacia el lumen, está comprobado que la proteína transmembranal puede existir en por lo menos dos topologías alternativas incluyendo un cambio en la orientación de su extremo carboxi-terminal, se piensa que las diferentes topologías, pueden presentar diferentes funciones^[36].

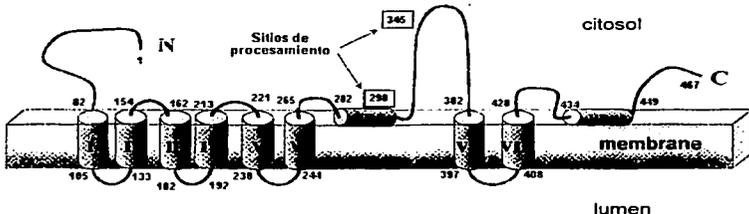


Figura 6. Estructura de la Proteína Pesenilina-1^[36].

1.3.3 Conservación entre especies



PS1 presenta homología con una gran variedad de organismos, se presenta en el reino animal a través de especies humanas, nemátodos, mosca de fruta y plantas^[36,59], comparte un 50% de homología con Sel-12 en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, un 57% con *Drosophila melanogaster* y un 90% con PS-alfa en *Xenopus laevis*^[18,36].

Estudios recientes revelan una homología del 33% en su secuencia primaria, entre PS1 humana y la planta *Arabidopsis thaliana*, la topología de la membrana de esta planta es muy similar a la de PS1 humana, también esta organizada en diez regiones hidrofóbicas con una asa grande o larga, entre las regiones HR7 y HR8, sin embargo el extremo amino-terminal hidrofílico que se presenta en PS1 humana parece estar ausente en esta planta^[36,59].

Al parecer el grado más alto de homología entre PS1 humana y otras especies reside en la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones hidrofóbicas^[36].

1.3.4 Localización y expresión

A nivel subcelular PS1 se localiza en el retículo endoplásmico tanto liso como rugoso y en los compartimientos intermedios entre el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi^[16,18,48,60-63], también se ha encontrado en la membrana nuclear en asociación con el cinetocoro y el centrómero, lo cual es compatible con su localización en el RE dada la continuidad de ésta estructura con el RE^[36,48,58]. Esta proteína es expresada ampliamente en el cerebro, la mayor parte en tejido periférico, esencialmente en el sistema nervioso central, es localizada en el cuerpo de un gran número de células neuronales^[16,18,36,43], por lo que se piensa que podría promover la morfología y función de las neuronas, además de mediar su actividad postmitótica. En *C. elegans* se ha observado que PS1 es requerida para la diferenciación de las neuronas, pero es necesario realizar más estudios para poder confirmar esta posibilidad^[64].

Niveles altos de PS1 son expresados en las regiones cerebrales afectadas por la EA, como el hipocampo, la corteza cerebral y la amígdala que son zonas ricas en placas seniles y marañas neurofibrilares, pero su expresión no es específica de éstas regiones, puede encontrarse también en neuronas localizadas en áreas del cerebro no afectadas por la EA^[35].

1.3.5 Procesamiento y degradación

La PS1 es fosforilada sobre residuos de serina, las modificaciones que sufre son sus divisiones proteolíticas^[36], las cuales se llevan a cabo en los cerebros humanos, así como en algunos otros mamíferos, la proteína completa de 47KD^[65], tiene una vida media de 60 minutos^[47] y es rápidamente procesada posiblemente por dos mecanismos proteolíticos diferentes: Uno de éstos parece involucrar al proteasoma y el otro involucra una serie de divisiones endoproteolíticas heterogéneas, que son llevadas a cabo por la enzima *presenilinas*, la cual actualmente no ha sido identificada, durante este procesamiento se generan dos fragmentos, uno de 28 a 30KD^[58] en su extremo amino-terminal y el otro de 18 a 19 kd en su dominio carboxi-

terminal^[36,40,65], este proceso está altamente regulado por la célula, la sobreexpresión de PS1 resulta en un ligero incremento de éstos productos que se acumulan en el interior de la célula sin modificar los niveles relativos de los dos fragmentos, que son degradados rápidamente por el proteasoma^[47].

La división de PS1 ocurre en el codón 298, codificado por el exón 9, este proceso no parece estar relacionado con la función patológica de las mutaciones en la EAF^[36], ni parece estar afectado por dichas mutaciones, a excepción de la mutación Cys410Tyr que ha demostrado ser resistente a la proteólisis^[58,65] o cuando ocurre una mutación que ocasiona la delección del exón 9, en el que este proceso no puede llevarse a cabo, debido a la ausencia del sitio de corte, pero sin embargo, si induce a un incremento en la producción del péptido A β ^[36], se ha mencionado que los fragmentos obtenidos del procesamiento de PS1 pueden interactuar físicamente y formar heterodímeros complejos de alto peso molecular, pero la función tanto de estos fragmentos como de los complejos permanece aún en discusión^[58].

PS1 puede ser también procesada por un tercer mecanismo endoproteolítico que involucra a miembros de la super familia de las caspasas, varios estudios han demostrado que algunos miembros de esta familia incluidas las caspasas 1, 3, 6, 7, 8 y 11 son capaces de dividir a PS1, por el extremo carboxi-terminal^[40,41], esta división es llevada a cabo en los residuos Asp329/Ser330 y Asp345/Ser346^[58] y está involucrada en la regulación de apoptosis, se le atribuye un efecto anti-apoptótico al fragmento carboxi-terminal derivado por caspasas, también está comprobado que la división de PS1 por este mecanismo no afecta el aumento en la producción del péptido A β producido por mutaciones en PS1, por lo tanto no tiene efecto sobre la amiloidogenesis y la señalización Notch, en la que parece estar involucrada^[40,41].

1.3.6 *Funciones biológicas*

a) Modelos transgénicos

Los modelos de animales transgénicos o knockout (KO), son una herramienta importante para estudiar las funciones de una proteína, varios grupos han realizado modelos de ratones transgénicos, utilizando el gen de PS1 en células embrionarias.

Los ratones KO con mutaciones homocigotas para PS1, no sobreviven al primer día de vida, mientras que aquellos con mutaciones heterocigotas pueden ser viables y fértiles y solo presentan algunas anomalías fenotípicas hasta la edad de 18 meses.

Los fenotipos observados en ambos modelos, son el deterioro en el desarrollo del esqueleto axial, los ratones que sobreviven al nacimiento tienen un peso bajo, una estatura corta, cola curvada y anomalías en la columna vertebral, asociado a la inflamación de los pulmones y posteriormente a la muerte por insuficiencia respiratoria. El origen de las anomalías esqueléticas es detectable al noveno día embrionario, interesantemente en animales KO para la proteína Notch y Dll-1 (homólogo de Notch en *Drosophila*), sufren una anomalía similar en la somitogénesis, por lo que se ha sugerido que hay una relación entre PS1 y Notch. Los animales KO para PS1 desarrollan hemorragias intracraneales variando el grado de severidad y el tiempo de inicio, la causa de esta hemorragia no está totalmente entendida, pero señalan algunos investigadores que la ausencia de PS1 es la causa directa de la pérdida neuronal en las células progenitoras, y la hemorragia intracraneal aparece como consecuencia de la pérdida de células y la severidad de las lesiones^[16,36,60,63].

b) Vía de señalización Notch

Los estudios en ratones transgénicos así como en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* han dado indicio de que PS1 esta funcionalmente implicada en la vía de señalización Notch^[12,48,60], la cual es importante para el desarrollo embrionario, la hematopoyesis y la diferenciación celular neuronal^[48,60], esto surgió del hecho de que Sel-12, homólogo de PS1 en *C. elegans*, es capaz de facilitar la señalización de los receptores de membrana lin-12, homólogo de Notch en el nemátodo^[36].

Las mutaciones de PS1 en *Drosophila* inducen un fenotipo letal debido al deterioro en la vía de señalización Notch^[36,62], así como en ratones KO de PS1 indican una reducción de Notch y Dll-1 desarrollando varios defectos fenotipicos parecidos a los que se observan en ratones KO para Notch o Dll-1^[36,66].

Notch es una proteína integral de membrana tipo I necesaria para el desarrollo embrionario dirige el destino celular a través de la unión de ligandos específicos de manera que media la comunicación intercelular, es procesada proteolíticamente por la proteasa furina, kuzbanian o por ambas en el aparato de Golgi, cerca del dominio extracelular. La cascada de transducción de señales se inicia cuando el fragmento que contiene el dominio transmembranal de Notch interactúa con su ligando, dada esta unión se realiza un segundo corte en la región extracelular del dominio carboxi-terminal, con lo que se provoca la liberación del dominio intracelular de Notch (NICD), el cual es trasladado al núcleo, donde activa la transcripción de genes relacionados con el destino de la célula^[47,48,62,67,68](Fig 7).

Varios grupos han demostrado que PS1 es necesaria para que se genere el dominio intracelular de Notch, con lo que se lleva acabo la transcripción de los genes Notch^[36,68,69], debido a que las mutaciones de PS1 en *Drosophila* inhiben completamente la división del segundo corte que sufre Notch en el dominio intracelular, por lo que la señalización es inhibida, esto establece una relación molecular entre Notch y PS1^[42,48,62].

El último paso en la división proteolítica de Notch es parecido al que realiza γ -secretasa durante el procesamiento de la APP^[36,42,66].

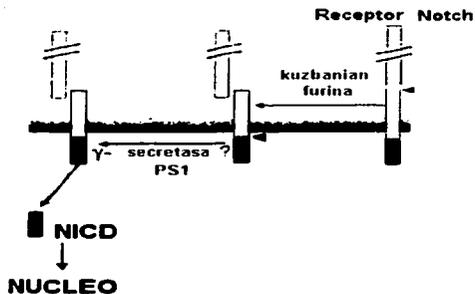


Figura 7. Procesamiento de la proteína Notch^[46].

La analogía entre el procesamiento de APP y Notch ha sido observada mediante inhibidores específicos de la actividad γ -secretasa, que interfieren con el procesamiento proteolítico de ambas proteínas^[48], inhibiéndose también la producción del NICD^[47]. También se menciona que PS1 y Notch interactúan físicamente en la membrana plasmática y que PS1 puede controlar la proteólisis de los dominios transmembranales tanto de Notch como de APP^[48,68,69], de ser esto cierto PS1 estaría involucrada directamente en la vía de señalización Notch y también en otras vías que requieran de la división intramembranal de otras proteínas integrales de membrana^[62].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

c) PS1 y actividad γ -secretasa

Aparentemente PS1 forma parte del mecanismo por el cual se realiza el procesamiento de la APP por γ -secretasa^[42], esto surge porque todas las mutaciones puntuales en PS1 causan un cambio en el corte del dominio transmembranal de la APP, de la posición 40 hacia la posición 42, lo que ocasiona un aumento en la producción del péptido A β de 42 aminoácidos^[62].

Basado en el modelo de 8 dominios transmembranales, los residuos de aspartato en las posiciones 257 y 385 (dominios TM6 y TM7), son necesarios para que se de una actividad de γ -secretasa de PS1 sobre la APP^[40,47,68], la sustitución de cualquiera de éstos residuos por el aminoácido alanina, reduce considerablemente la producción del péptido A β , a la vez que produce una acumulación de los sustratos de γ -secretasa producidos por α secretasa (C83) y por β secretasa (C99)^[42,47,62].

Se piensa que existe una unión entre la APP y PS1, antes de que la APP se transporte al aparato de Golgi donde es procesada por α y β secretasas^[62], también se ha señalado que el papel de PS1 durante el procesamiento de la APP podría darse a través de distintas funciones, como la de influir en el transporte de la APP, en el de γ -secretasa o en el de ambas, puesto que el péptido A β es producido en la vía endocítica, mientras que las presenilinas son localizadas en su mayor parte en el retículo endoplásmico, o actuar como cofactores de γ -secretasa e incluso ser ellas mismas, como se ha demostrado en varios estudios^[40,42,47,70], en los que se inhiben estas actividades en modelos celulares que carecen de PS1, lo que indica una relación directa entre esta y la APP^[47]. Sin embargo la relación exacta entre las mutaciones en PS1, la influencia sobre γ -secretasa y el aumento en la producción del péptido A β producido por la APP no esta completamente clara^[40,41].

d) Vía β -catenina

Recientemente se ha descrito una asociación entre PS1 y la vía de señalización implicada en la degeneración neuronal, la cual se da mediante la unión a la proteína β -catenina, las cateninas forman una familia de proteínas codificadas por genes parecidos a los genes del Armadillo, los cuales se caracterizan por codificar una serie de aminoácidos repetidos, que son capaces de interactuar con la asa grande de PS1.

β -catenina es una proteína citoplasmática que se encuentra implicada en procesos de regulación celular, es componente de la unión adhesiva entre célula y célula, incluyendo la sinapsis, interactúa con moléculas de adhesión como cadherina y tiene un papel en la cascada de señalización wingless en invertebrados y Wnt en vertebrados, las cuales intervienen en el desarrollo de proliferación celular^[36,47].

Los niveles citoplásmicos de β -catenina libre son controlados por Glutaminasintetasa Cinasa-3 β , con siglas en inglés (GSK-3 β). GSK-3 β fosforila a β -catenina que es ubiquitinada y rápidamente degradada por el proteasoma.

Con la activación de la vía Wnt la actividad de GSK-3 β es inhibida y en consecuencia β -catenina libre es estabilizada y acumulada en el citoplasma, donde se une al factor de transcripción nuclear (TCF), finalmente el complejo TCF/ β -catenina, se translada al núcleo donde se inicia la transcripción de genes^[36,40](Fig 8).

Algunos estudios señalan que β -catenina y PS1 forman un complejo que aumenta la estabilidad de β -catenina y que las mutaciones patogénicas en PS1 afectan la estabilidad de dicha proteína, e interfieren con su translocación al núcleo^[40,71]. En fibroblastos de pacientes con EA portadores de alguna mutación en PS1 se ha identificado, que la translocación nuclear de β -catenina es reducida después de la activación de la cascada de señalización Wnt, así como también se observa un aumento en la degradación de β -catenina en cerebros de pacientes con EA que portan alguna mutación en PS1, al igual que en ratones transgénicos^[36].

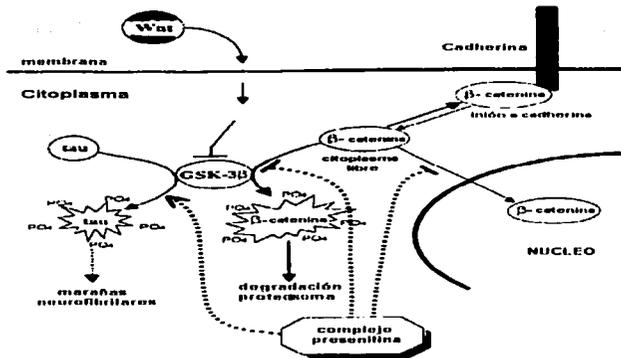


Figura 8. Vía β-catenina^[40].

β-Catenina puede estar directamente ligada a la muerte de células neuronales, al reducirse la señalización de β-catenina aumenta la vulnerabilidad para la apoptosis neuronal inducida por el péptido Aβ, los complejos PS1/β-catenina pueden estar relacionados con diferentes vías bioquímicas relacionadas a la neurodegeneración, al respecto se ha mencionado que GSK-3β no solo regulariza la distribución intracelular de β-catenina, también puede estar involucrada en la regulación y fosforilación de tau contribuyendo a la agregación y al desarrollo de las marañas neurofibrilares en los cerebros con EA, esta hipótesis fue propuesta debido a que existen reportes de que PS1 es capaz de unirse directamente a tau y a GSK-3β y que esta interacción se ve aumentada con las mutaciones en PS1, además de que éstas mutaciones facilitan la fosforilación de tau^[36,40].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

e) Interacción con Nicastrina

Algunos estudios sobre PS1 mencionan que puede tener actividad catalítica por sí misma, mientras que otros indican que para que esta actividad se lleve a cabo se requiere de la interacción con otras proteínas, estudios recientes han identificado a una proteína llamada nicastrina, que es una glicoproteína transmembranal de tipo I^[72], codificada por un gen localizado en el cromosoma 1q21.1^[73] la cual es capaz de interactuar con PS1 y formar un complejo de alto peso molecular, esencial para que se de la actividad de γ -secretasa y se lleve a cabo la proteólisis de proteínas como APP y Notch^[73-75]. En estudios realizados en *Drosophila melanogaster*, se ha podido identificar que nicastrina parece estar involucrada en el transporte de PS1 hacia la superficie celular, esto podría indicar que una parte de PS1 unida a nicastrina puede ser liberada hacia el retículo endoplásmico y llevada hacia la superficie celular donde interactúa con los sustratos de γ -secretasa^[75].

Al parecer el complejo formado por Nicastrina y PS1 modula la producción del péptido A β que se produce a partir de la APP (Fig 9), mientras que la supresión de la expresión de nicastrina en los embriones de *C.elegans* induce a fenotipos Notch similares a los que se inducen por mutaciones en Sel-12, homólogo de PS1 en *C. elegans*.

De modo que si nicastrina actúa sobre proteínas tan diferentes como la APP y Notch, es posible que su función sea más general y que este involucrada en el procesamiento de muchas otras proteínas que también estén localizadas en la membrana celular, aunque su función exacta no esta completamente comprobada^[74], y los polimorfismos del gen son actualmente investigados^[73].

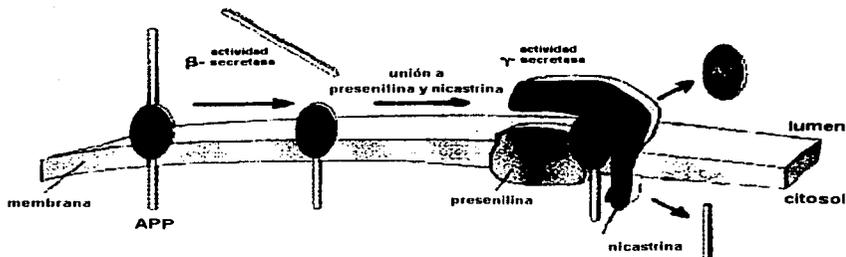


Figura 9. Complejo formado entre PS1 y Nicastrina^[74].

f) Otras funciones

La utilización del doble híbrido de levadura ha permitido identificar varias interacciones entre diversos dominios de PS1 con otras proteínas^[36,47], entre las que se encuentran: Las proteínas G y G_o que interactúan con el dominio carboxi-terminal de PS1, lo que podría indicar un papel de PS1 como regulador en la activación de las proteínas G^[36,58], las proteínas relacionadas con el citoesqueleto, la filamina muscular y su homólogo Rh1 que interactúan con la asa grande de PS1 localizada entre los dominios TM6 y TM7, estas dos proteínas se han localizado en lesiones intracelulares típicas de la EA y pueden ser un eslabón entre PS1 y la disfunción del citoesqueleto que se da en la EA^[31,36,47], en otros estudios se observó la interacción entre el mismo dominio de PS1(asa grande) y la proteína Rab II, una pequeña GTPasa perteneciente a la familia p21 ras^[36,47,60,71].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

También se ha mencionado que puede interactuar con la proteína GSK-3 β ^[40,58,71], con la telencefalina que es un miembro de la subfamilia de moléculas de adhesión intercelular (ICAM), a la cual puede unirse por el extremo carboxi-terminal^[76], así como también a una proteína llamada calsenina perteneciente a la familia de los sensores del calcio^[31,47], la interacción entre PS1 y calsenina podría ser un eslabón entre la función de PS1 y la vía de regularización intracelular de los niveles de calcio^[36]. Algunos estudios han demostrado que las mutaciones en PS1 pueden tener un efecto tóxico para las células, al provocar la liberación del calcio del retículo endoplásmico, la calsenina parece compensar el aumento en la concentración de calcio intracelular que se produce en células transfectadas con mutaciones en PS1 sin unir el calcio directamente si no a través del dominio carboxi-terminal de PS1, todos estos datos indican que una parte del daño neuronal provocado por la presencia de mutaciones en PS1 puede deberse a la desregulación de la homeostasis del calcio intracelular que provoca la muerte de la célula^[47,61,77].

o

1.3.7 Funciones patológicas

a) Modificación del procesamiento de la APP

Un efecto definitivo de las mutaciones patogénicas en PS1 es la modificación en el procesamiento de la APP, induciendo al aumento de la concentración del péptido A β de 42 aminoácidos. los pacientes con EA portadores de mutaciones en PS1, tienen incrementados los niveles de A β en el plasma, al mismo tiempo se dan depósitos masivos del péptido en el cerebro^[36,40].

El aumento del péptido A β de 42 aminoácidos se ha podido observar en fibroblastos, en células transfectadas y en ratones transgénicos, este aumento varía entre diferentes mutaciones en PS1, pero no esta relacionado con la edad de inicio de la enfermedad.

Se piensa que la integridad de PS1 es importante para poder modificar el procesamiento de la APP y que el efecto sobre el péptido A β de 42 aminoácidos es conferido solo por la expresión de la proteína completa y no por los fragmentos generados de su procesamiento^[36].

Hasta hoy los mecanismos por los cuales la PS1 afecta el procesamiento de la APP no han sido completamente demostrados, uno de los modelos propone que PS1 esta involucrada en la regulación del tránsito intracelular de la APP llevándola hasta los compartimentos específicos de la actividad de γ -secretasa, otros sugieren que PS1 puede por si misma tener actividad de γ -secretasa como se ha mencionado anteriormente^[36,40].

La interacción física entre ambas proteínas en el reticulo endoplásmico, es el mecanismo más acertado, para la explicación de la modificación en el procesamiento de la APP, ya que al parecer el péptido A β es producido específicamente en el reticulo endoplásmico.

Sin embargo otros estudios indican que las mutaciones en PS1 pueden no afectar directamente la interacción con la APP, pero si modificar la estructura del complejo PS1/APP, cambiando directamente el sitio de división de la APP o interfiriendo con el tránsito de la misma^[36].

b) Apoptosis y muerte celular

Diversos resultados mencionan que PS1 puede estar involucrada en la regulación de la apoptosis, o estrés celular, debido a la pérdida neuronal masiva observada en la patología de la EA, así como por la gran cantidad de DNA fragmentado identificado en células neuronales y de la glia^[13,36].

En ratones transgénicos con mutaciones en PS1 se ha identificado una aceleración en el proceso de muerte celular y un aumento en la muerte neuronal.

En células transfectadas con mutaciones en PS1 se ha demostrado un aumento en la movilización de calcio en el retículo endoplásmico, así como la producción de superóxido y de especies reactivas de oxígeno mitocondrial, esta producción induce a la activación de las caspasas, con lo que se iniciaría el proceso de apoptosis.

Esta observación sustenta la hipótesis de un déficit mitocondrial en la EA y el posible papel de PS1 en la apoptosis, ya que las mutaciones en PS1 en pacientes con EA pueden sensibilizar a las neuronas para inducir el estrés celular^[36].

Sin embargo mientras las mutaciones en PS1 aumentan la susceptibilidad a la apoptosis^[36,78], la expresión de PS1 en varios modelos, sugiere que su expresión puede estar relacionada con la protección o recuperación del daño neuronal, ya que algunos autores han observado la preservación de PS1 inmunoreactiva en neuronas de cerebros con EA, aunque esto debe ser confirmado por estudios posteriores^[36].

2

Objetivos

2.1 *Objetivo general*

- ◆ Determinar si existen mutaciones en los exones 5, 6, 7, 8 y 11 del gen de *Presenilina-1* mediante la utilización de enzimas de restricción e hibridación, con la finalidad de confirmar el diagnóstico de pacientes con probable enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano.

2.2 *Objetivos particulares*

- ◆ Determinar mutaciones por la presencia o ausencia de sitios de restricción en los exones 5, 6, 7 y 8 del gen de *Presenilina-1*, en pacientes con probable enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano.
- ◆ Determinar, si en éstos pacientes existe mutación en el exón 11 del gen de *Presenilina-1*, por hibridación con un oligonucleótido mutado y uno silvestre.
- ◆ En caso positivo, establecer la frecuencia con la que se presentan éstas mutaciones en los exones 5, 6, 7, 8 y 11 del gen de *Presenilina-1* y compararlas con las reportadas en otras poblaciones.

3

Material y Métodos

3.1 Material y reactivos

- Balanza analítica (Libror-AEG220)
 - pH metro (Beckman)
 - Bomba de vacío
 - Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5804R)
 - Microcentrífuga (Warning)
 - Vortex (Fischer)
 - Baño María con agitación (Cole-Parmer)
 - Espectrofotómetro uv/visible (Beckman DU-40)
 - Celdas para U.V
 - Campana de flujo laminar (Veco)
 - Termociclador (Perkin Elmer 9600)
 - Termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient)
 - Sistema de electroforesis horizontal (GibcoBRL)
 - Sistema de electroforesis vertical (BRL)
 - Fuentes de poder (Bio-RAD Power/Pac 3)
 - Equipo de Dot-blot
 - Transiluminador de luz U.V (Cole Parmer)
 - Cámara fotográfica (Polaroid instantánea)
 - Incubador de hibridación (Robbins scientific 400)
 - Tubos para microcentrífuga
 - Tubos Falcon
 - Tubos Eppendorf
 - Micropipetas
 - Puntas para micropipetas
 - Material de cristalería diverso.
-
- Agarosa (GibcoBRL)
 - Acrilamida (Sigma Chemical)
 - Bromuro de etidio (Schwarz/Mann Blotech)
 - Ampliqa (Roche)
 - Master Mix (Quiagen)
 - dNTP's : dATPs, dTTPs, dCTPs y dGTPs (Promega)
 - Marcador de PM No VIII, 19-1114pb (Roche)
 - Radiactivo α -³²P-dCTP (K.R AMTMANN S.A)
 - Kit de marcaje Random Primer Labeling System (GibcoBRL)
 - Solución de hibridación (GibcoBRL)
 - Membranas de nylon
 - Oligonucleótidos (primers) para c/u de los exones (Biosource)
 - Enzimas de restricción: Rca I (5U/ μ l), Dde I, Nla III y Pvu II (10U/ μ l) (GibcoBRL, Biolabs y Promega)
 - Fenol ultrapuro (GibcoBRL)

- Fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico 25:24:1 (GibcoBRL)
- Cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1)
- Persulfato de amonio 10%
- TEMED (Sigma)
- SSC 2X y 20X
- SDS 0.1 y 0.5 %
- Etanol absoluto y al 70 % (J.T Baker)
- Isopropanol (J.T Baker)
- TBE 1X y 10X
- Amortiguador BLCR
- Amortiguador BLCB
- Amortiguador BLCB con proteinasa K

3.2 *Material biológico*

36 muestras de ADN de pacientes con probable enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano, con un rango de edad de 34-55 años y un promedio de 45 años, pertenecientes a 12 familias todos hijos y nietos de mexicanos o con un abuelo español, estudiados en la clínica de demencia y de Genética del INNN que cumplen los criterios propuestos por MCKHANN y colaboradores, así como los criterios DSMIVR del grupo de NINCDS-ADRD para probable enfermedad de Alzheimer.

50 muestras de ADN controles, obtenidas de personas no relacionadas entre si, ni con ninguno de los pacientes, con un rango de edad de 20-94 años y un promedio de 55 años. Las muestras fueron tomadas de personas sanas que asisten a donar sangre al INNN y de un grupo de jubilados del INSEN (Ins Nac de la Senectud), todos hijos y nietos de mexicanos o con un abuelo español. A todos los individuos mayores de 60 años se les aplicó la prueba corta del estado mental de Folstein, la cual se encontró dentro de los límites normales.

3.3 Diagrama de flujo

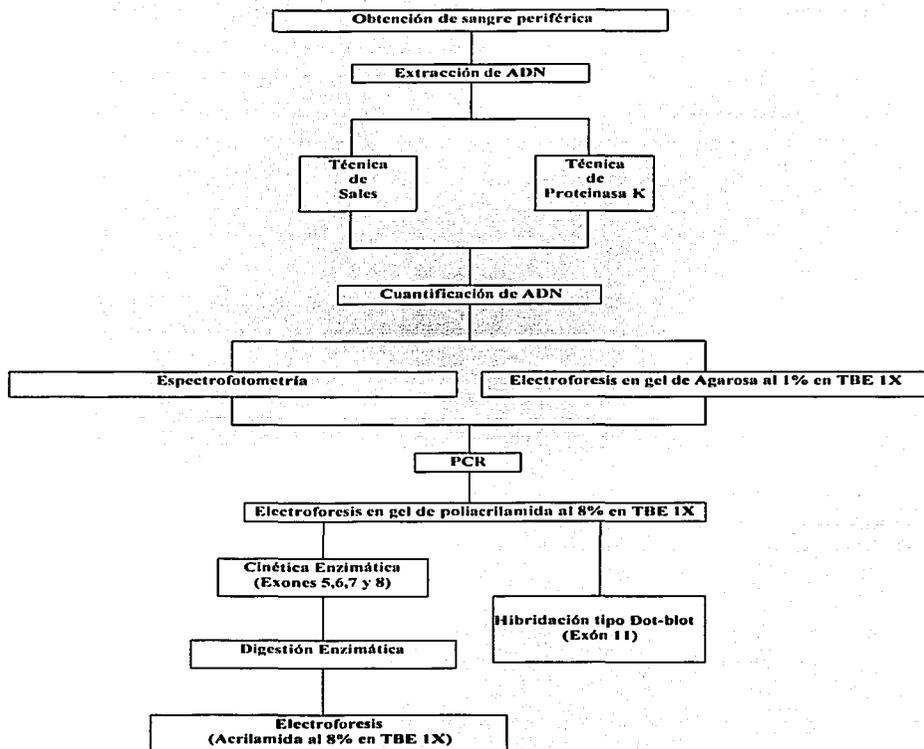


Figura 10. Diagrama de flujo del método en general.

Métodos

3.4 Obtención de muestra sanguínea

Para obtener el ADN se extrajeron aproximadamente 20 ml de sangre periférica por punción venosa en tubos vacutainer con anticoagulante ácido cítrico dextrosa (ACD), a todos los pacientes y controles.

3.5 Extracción de ADN

Se realizó por dos técnicas: La técnica de precipitación con sales, extracción fenol-cloroformo y la técnica de Proteinasa K, dependiendo de la cantidad de sangre obtenida y con la finalidad de utilizar el ADN extraído en mejores condiciones por cualquiera de las dos técnicas.

Técnica de Sales Fenol-Cloroformo

Esta técnica se basa en la utilización de altas concentraciones de sales que alteran la permeabilidad de la membrana celular de los leucocitos, dejando libre el ADN, que es extraído con fenol saturado (el cual desnatura las proteínas), fenol-cloroformo (que remueve las trazas de fenol saturado) y cloroformo alcohol isoamílico (que elimina los residuos de fenol-cloroformo), además el cloroformo desnatura proteínas y el alcohol isoamílico reduce la formación de espuma durante la extracción, con esta mezcla se facilita la separación de las fases acuosa y orgánica.

Para esta técnica se siguieron los siguientes pasos: Se realizó la lisis de glóbulos rojos con el amortiguador BLCR centrifugando a 5000 rpm, 4° C por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se repitió este paso hasta obtener el botón de glóbulos blancos, al cual se le adicionó el amortiguador BLCB centrifugando a 11000 rpm.

La extracción del ADN se realizó con fenol saturado, fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico en una proporción de 25:24:1 y la última extracción se llevo acabo con cloroformo-alcohol-isoamílico 24:1, centrifugando a 11000 rpm durante 10 minutos en cada extracción. El ADN obtenido fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol al 70% y resuspendido en agua estéril.

Técnica de proteinasa K

La proteinasa K es una proteasa con propiedades para degradar proteínas comúnmente contenidas en preparaciones de ácidos nucleicos. En esta técnica el proceso de lisis de glóbulos rojos se realizó igual que en la técnica de sales, pero en este caso al botón de leucocitos se le adicionaron 5 ml del amortiguador BLCB con proteinasa K y se dejó incubar los leucocitos junto con el amortiguador a 42 °C durante 3 horas, o toda la noche con agitación constante. La extracción y el lavado del ADN también se realizó igual que en la otra técnica y para la precipitación se agregaron 72 µl de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto.

3.6 *Cuantificación del ADN*

Espectrofotometría

Espectrofotométricamente el ADN absorbe luz ultravioleta y se puede cuantificar a una λ de 260nm realizando una dilución 1:100, su concentración se calcula en ng/µl, (1 D.O = 50 ng de ADN). Las proteínas también se miden a una λ de 280nm para calcular la pureza del ADN, que se obtiene por la relación entre la $D.O_{260}/D.O_{280}$ y el valor debe ser de 1.8 a 2.0.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X, para observar cualitativamente la cantidad e integridad del ADN en el gel, éste fue teñido con bromuro de etidio y observado en un transiluminador de luz ultravioleta. La cantidad de ADN presente en la muestra se puede estimar por la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio, un colorante que se intercala entre el ADN y flourece con la luz ultravioleta, observándose la cantidad e integridad de ADN, el cual puede ser comparado con un marcador de PM conocido.

3.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Una vez que se obtuvo el ADN, se establecieron las condiciones necesarias para la amplificación de los exones 5, 6, 7, 8 y 11 del gen de *Presenilina-1*, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Este método permite la amplificación de un segmento de ADN, utilizando la secuencia o fragmento seleccionado, el cual es flanqueado en ambos extremos por un par de oligonucleótidos sintéticos complementarios que actúan como iniciadores para la síntesis de ADN, mediante la utilización de los desoxirribonucleótidos trifosfatos, dATP, dTTP, dGTP, dCTP y una polimerasa de ADN.

El método se realiza a través de ciclos consecutivos, cada ciclo comprende 3 pasos: La *desnaturalización* en cadenas sencillas del ADN que se requiere amplificar, este paso se realiza a una temperatura de 90-95°C, la *alineación* de los oligonucleótidos con sus secuencias complementarias a una temperatura de 55-60°C y finalmente la *extensión* de las cadenas de ADN por la acción de una polimerasa de ADN a una temperatura de 72°C.

Cada ciclo duplica la cantidad de ADN, por lo que ciclos consecutivos de PCR permiten obtener millones de copias del fragmento de interés en pocas horas.

Se amplificó el ADN de todas las muestras por el método de PCR, para cada uno de los exones, las condiciones de reacción fueron diferentes para cada una, pero en general se utilizaron 2 programas de PCR y 2 mezclas de reacción diferentes, una de master mix, que es una mezcla que contiene el amortiguador para la enzima taq polimerasa, los dNTPs y la taq polimerasa juntos y otra que se realiza con los reactivos por separado.

Reactivos	Mezcla 1	Mezcla 2
ADN genómico (100ng/μl)	3.0 μl	3.0 μl
Oligonucleótido 1 (25μM)	2.0 μl	2.0 μl
Oligonucleótido 2 (25μM)	2.0 μl	2.0 μl
Master Mix	10 μl	-----
Amortiguador MgCl ₂ (15mM)	-----	3.0 μl
dATPs (10mM)	-----	1.0 μl
dTTPs (10mM)	-----	1.0 μl
dCTPs (10mM)	-----	1.0 μl
dGTPs (10mM)	-----	1.0 μl
Taq polimerasa (5U/μl)	-----	2U = 0.4 μl
H ₂ O (V _r = 30 μl)	13 μl	15.6 μl

Tabla 4 . Condiciones de reacción utilizadas para la amplificación de las muestras.

Las mezclas de reacción se sometieron a los siguientes programas de PCR.

	Programa No 1	Programa No 2
Desnaturalización inicial de 94°C durante 15 minutos o 5min.		
1.- Desnaturalización	94°C/20seg	94°C/30seg
2.- Alineación	58°C/20seg	55°C/30seg
3.- Extensión	72°C/30seg	72°C/45seg
Ciclos (3 pasos)	35	35
Extensión final	72°C/5 min	72°C/5 min
Final de la reacción	4°C ~	4°C ~

Tabla 5. Programas de PCR utilizados.

Los programas fueron los mismos utilizando cualquiera de las dos mezclas de reacción, a excepción de la desnaturalización inicial, que en la mezcla No 1 se realizó a 94°C durante 15 minutos, mientras que con la mezcla No 2, se realizó a la misma temperatura pero en 5 minutos.

Oligonucleótidos (*Primers*) utilizados

EXON 5 (335 pb)	
5-3	5'- GATTGGTGAGTTGGGGAAAAGTG -3'
5-4	5'- ATTCCAACCATAAGAAGAACAGG -3'
EXON 6 (228pb)	
927	5'- TCTGTACTTTTAAAGGGTTGT -3'
928	5'- ACTTCAGAGTAATTCATCANCA -3'
EXON 7 (326pb)	
7-1	5'- GGAGCCATCACATTATTCTAAA -3'
7-2	5'- AACAAATTATCAGTCTTGGGTTT -3'
EXON 8 (215pb)	
8-1	5'- TTACAAGTTTAGCCCATACATTTT -3'
8-2	5'- TCAAGTTCCCGATAAATTCTAC -3'
EXON 11 (216 pb)	
885	5'- TGGAGACTGGAACACAAC -3'
893	5'- GTGTGGCCAGGGTGAAGAACT -3'

3.8 Electroforesis

La electroforesis es un método que permite la identificación, y/o separación de fragmentos de ADN, en geles de agarosa o poliacrilamida.

La técnica consiste en sumergir el gel en un amortiguador, cargar el ADN en los pozos del gel y aplicar una corriente eléctrica, lo que permite que el ADN se mueva a través del gel, dependiendo de su tamaño o PM, migrando hacia el lado positivo de la cámara, debido a que éste se encuentra cargado negativamente.

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % en TBE 1X durante 2 horas a 300 Volts, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz UV, con la finalidad de observar los productos amplificados de cada uno de los exones y verificar el tamaño del producto esperado, comparándolo con un marcador de PM conocido con un rango de 19-1114 pb. Finalmente se tomaron fotografías de los geles.

3.9 Cinética enzimática

Se utilizaron muestras controles para realizar una cinética enzimática con las enzimas de restricción Rca I, Nla III, Dde I y Pvu II, utilizando 1, 5, 10 y 15 unidades de cada enzima, las reacciones se efectuaron a 37°C durante 4 horas y toda la noche (Over night), para establecer la cantidad y tiempo óptimo de digestión del ADN amplificado, para los exones 5,6,7 y 8.

3.10 Digestión enzimática

El ADN puede ser digerido o cortado por enzimas llamadas endonucleasas o enzimas de restricción, que reconocen secuencias específicas de ADN, con lo que se pueden generar fragmentos de interés específicos.

El análisis de los exones 5,6,7 y 8 se realizó mediante el uso de enzimas de restricción, para lo cual se utilizaron 10 µl de ADN amplificado, 2 µl de amortiguador 10X, 10U de enzimas de restricción y 7 µl de H₂O para una mezcla de reacción de 20 µl, los productos amplificados fueron digeridos con su respectiva enzima de restricción durante 4 horas a 37°C (Condiciones establecidas con previa cinética).

Exón	Mutación	Enzima de Restricción	Sitio de reconocimiento
5	Tyr115Cys	Rca I	5'.....T↓CATGA.....-3'
6	His163Arg	Nla II	5' -CATG↓.....-3'
7	Ala231Val	Dde I	5'.....C↓TNAG.....-3'
8	Leu286Val	Pvu II	5'.....CAG↓CTG.....-3'

Tabla 6. Enzimas de restricción utilizadas para la búsqueda de mutaciones en los exones 5,6,7 y 8 del gen PS1.

3.11 Electroforesis

Los fragmentos de ADN generados por la digestión con las enzimas de restricción se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 %, en TBE 1X durante 2 horas a 300 volts, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta, el tamaño de los productos esperados se comparó con un marcador de PM conocido (19-1114 pb).

3.12 Hibridación en gota tipo Dot-blot

Para identificar la mutación **Cys410Tyr** que se localiza en el exón 11, se utilizó la técnica de *Hibridación en gota tipo Dot-blot*, este método se realizó a través de los siguientes pasos: 1) se *desnaturalizaron* 10 μ l del producto amplificado del exón 11 a una temperatura de 95°C durante 3 minutos, 2) este ADN fue *transferido* junto con 40 μ l de SSC 20X a una membrana de nylon aplicando vacío, 3) el ADN se *fijó* a la membrana exponiéndola a luz ultravioleta durante 5 minutos.

Se hicieron membranas por duplicado ya que para el análisis se requiere del empleo de dos sondas por separado. 4) Se realizó una *prehibridación* colocando cada una de las membranas en un tubo de hibridación, agregando 30 ml de solución de prehibridación e incubando a 65°C con agitación durante 2 horas, 5) posteriormente los oligonucleótidos empleados como sondas se *marcaron* con el radiactivo α -³²P-dCTP, según el kit de Random Primer y a cada tubo se le adicióno la sonda correspondiente previamente desnaturalizada a 95°C por 3 minutos.

Sondas de hibridación

890 (Oligonucleótido silvestre) 5'- CCA-TGA-CCT-GTT-TCG-TAG-C -3'
891 (Oligonucleótido mutado) 5'- CCA-TGA-CCT-ATT-TCG-TAG-C -3'

6) Las membranas contenidas en los tubos se incubaron con agitación durante toda la noche a 65°C para llevar a cabo la *hibridación*, 7) Se *lavarón* para eliminar el exceso de sonda no incorporada, esto se realizó adicionando a cada tubo mezclas de soluciones de SSC 2X con SDS 0.5 % y SSC 2X con SDS 0.1 %, incubando con agitación lenta a 65°C durante 15 y 5 minutos respectivamente, 8) las membranas fueron depositadas en una bolsa de plástico y colocadas en un cassette con placa de rayos X (*autorradiografía*), para ser reveladas y observar una mancha oscura en todos aquellos fragmentos que fueron complementarios a la sonda de ADN utilizada.

4

Resultados

4.1 Extracción y cuantificación de ADN

Las 36 muestras de ADN utilizadas para el análisis de los exones 5, 6, 7, 8 y 11 del gen PS1 fueron extraídas por las dos técnicas utilizadas para la extracción. Se obtuvo más de una muestra de cada paciente, las cuales fueron cuantificadas por espectrofotometría y observadas en gel de agarosa al 1 %. Las concentraciones de ADN obtenidas por espectrofotometría variaron entre 330 y 2520 ng/ μ l, las más bajas se encontraron entre 170 y 260 ng/ μ l.

Se seleccionó una muestra de ADN de cada paciente. El ADN que se encontró en mejores condiciones ya sea de integridad (observado en gel de agarosa) o de concentración fue utilizado para la amplificación por PCR de cada uno de los exones.

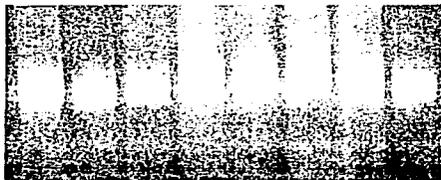


Figura 11. Muestras de ADN en gel de agarosa al 1%.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se amplificaron las 36 muestras por medio de la técnica de PCR bajo las condiciones establecidas para cada uno de los exones, en la figura 12 se muestran los productos amplificados de los exones 5, 6, 7, 8 y 11 del gen de PS1, los cuales constan de 335, 228, 326, 215 y 216 pares de bases respectivamente, estos productos fueron observados a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.



Fig 12. Gel de poliacrilamida al 8 % que muestra los productos obtenidos de la amplificación por PCR, de los exones 5,6,7,8 y 11 del gen PS1, comparados con un marcador de peso molecular (M).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3 Cinética y digestión enzimática de los exones 5, 6, 7 y 8.

La búsqueda de mutaciones en los exones 5, 6, 7 y 8 del gen de PS1 se determinó por la presencia o ausencia de sitios de restricción, mediante el uso de la enzima de restricción correspondiente para cada exón, los productos obtenidos por la digestión enzimática en caso de presencia o ausencia de mutaciones se presentan en la siguiente tabla.

Exón	Mutación	Producto Amplificado	Producto Normal	Mutación Homocigota	Mutación Heterocigota
5	Tyr115Cys	335pb	(+)100 y 235 pb	(-) 335pb	(+/-) 100, 235 y 335 pb
6	His163Arg	228pb	(+)26,68 y 132 pb	(-) 26 y200 pb	(+/-) 26, 68, 132 y 200 pb
7	Ala 231Val	326pb	(-) 326pb	(+) 98 y 228 pb	(+/-) 98, 228 y 326 pb
8	Leu286Val	215pb	(-) 215pb	(+) 93 y 122 pb	(+/-) 93, 122 y 215 pb

(+) Presencia de sitio de restricción
(-) Ausencia de sitio de restricción

Tabla 7. Mutaciones a identificar y productos obtenidos de la digestión enzimática, por la presencia o ausencia de sitios de restricción.

Se emplearon muestras de ADN de individuos controles para realizar la cinética enzimática de los exones 5, 6, 7 y 8 y se estableció que la digestión de todas las muestras amplificadas para los 4 exones, se realizaría durante 3 horas a 37°C, utilizando 10U de enzima de restricción para cada una, considerando que en caso de existir alguna mutación en cualquiera de los exones, sobre todo en los que las mutaciones generan un sitio, la cantidad de enzima sería necesaria para la digestión completa de los productos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados obtenidos del análisis de los exones 5, 6, 7 y 8 se presentan a continuación.

Tyr115Cys esta mutación fue identificada en el *exón 5*, en la que el cambio de una A→G en el nucleótido 314, localizado en el TM II, causa la sustitución del aminoácido tirosina por cisteína en el codón 115^[7,18,35,36], la presencia de esta mutación elimina un sitio de restricción, por lo que para identificarla se utilizó la enzima de restricción Rca I.

En la cinética enzimática realizada a muestras controles, de manera normal la enzima Rca I reconoce un sitio y genera fragmentos de aproximadamente 100 y 235 pares de bases, debido a esto, en todas las muestras controles se obtuvieron productos de digestión de 100 y 235 pares de bases. En una mutación homocigota, al inhibirse el sitio de reconocimiento, se obtendría el producto completo de 335 pares de bases, es decir no habría digestión, en una mutación heterocigota los fragmentos generados serían de 100, 235 y 335 pares de bases, como se indica en la tabla No 7.

Los mejores resultados de la cinética enzimática se obtuvieron realizando la digestión durante 3 horas a 37°C, condición en la cual se digirieron todos los productos hasta con 1U de enzima de restricción, no así los digeridos durante toda la noche (over night), ya que en este caso la digestión completa se llevó a cabo con 15U de enzima de restricción (fig 13a).

En todas las muestras analizadas para el *exón 5* se obtuvieron productos de digestión normales (100 y 235 pb), lo que indica que ningún paciente porta la mutación *Tyr115Cys* (fig 13b).

**Exón 5
(Tyr115Cys)**

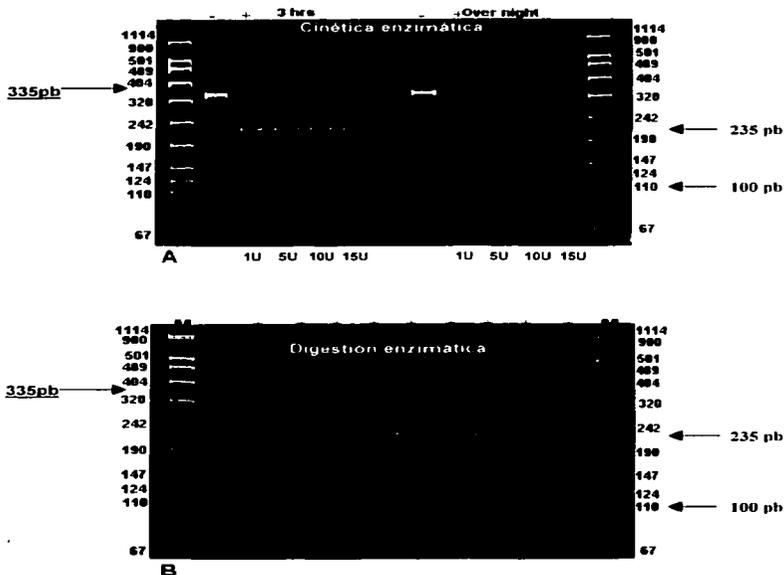


Fig 13. Geles de poliacrilamida al 8% que muestran, a) la cinética y b) la digestión enzimática del exón 5. Los carriles con signo (-), corresponden a productos sin digerir y los (+) a los productos digeridos con la enzima de restricción Rca I.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

His163Arg, mutación localizada en el exón 6 en el HL II, entre el TM II y TM III, debida a la sustitución de una A→G en el nucleótido 488, causando la mutación que resulta en el cambio del aminoácido histidina por arginina en el codón 163^[17,18,35,36,44,79], la presencia de esta mutación también elimina un sitio de restricción.

En individuos normales la enzima Nla III reconoce dos sitios, generando productos de 26, 68 y 132 pares de bases, la mutación genera fragmentos de 26 y 200 pares de bases en el caso de ser homocigota y de 26, 68, 132 y 200 pares de bases si es heterocigota (tabla 7).

En la cinética enzimática realizada a este exón, las muestras controles fueron digeridas utilizando desde 1U de enzima de restricción, tanto a 3 horas como over night (fig 14a), pero la digestión enzimática de las muestras de los pacientes se realizó con 10U de enzima de restricción, como se indicó anteriormente.

Los resultados de la digestión de las muestras fueron negativos para la búsqueda de la mutación *His163Arg*, ya que en todos los pacientes se obtuvieron productos normales de 26, 68 y 132 pares de bases (fig 14b).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Exón 6
(His163 Arg)**

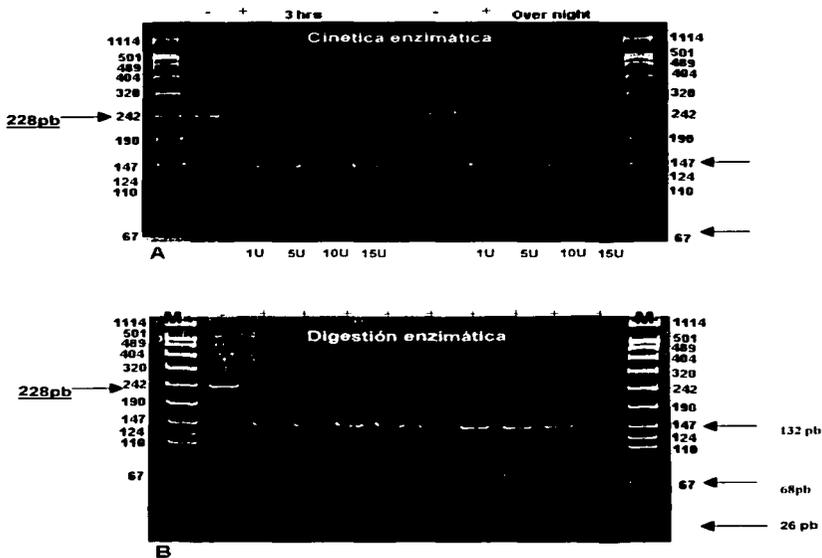


Fig 14. Geles de poliacrilamida al 8% que muestran, a) la cinética y b) la digestión enzimática del exón 6. Los carriles con signo (-) corresponden al producto sin digerir y los (+) a los digeridos con la enzima de restricción Nla III.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ala231Val, la mutación sustituye una C→T en el nucleótido 692, causando el cambio del aminoácido alanina por valina en el codón 231 correspondiente al *exón* 7 localizado en el TM V^[7,18,36], en este caso esta mutación genera un sitio de restricción, contrario a lo que sucede en los exones 5 y 6, en donde los sitios de restricción se inhiben por la presencia de las mutaciones.

Los productos generados por la digestión enzimática en caso de existir la mutación *Ala231Val*, serían de 98 y 228 pares de bases (mutación homocigota) y de 98, 228 y 326 (mutación heterocigota), mientras que en el producto sin mutación (normal) estará ausente el sitio y por lo tanto no se digiere el producto observándose una banda de 326 pares de bases (tabla 7).

Debido a esto en la cinética enzimática no se esperaba obtener fragmentos de digestión, ya que la enzima Dde I no reconoce su sitio, por no haber mutación en los individuos controles sanos, la cinética se realizó de la misma forma que en los demás exones (fig 15a).

La digestión de los pacientes se realizó con 10U de enzima de restricción durante 3 horas a 37°C considerando que en caso de existir alguna mutación la cantidad de enzima sería necesaria para digerir las muestras y generar el patrón de bandas esperado.

En los resultados de esta digestión ninguna muestra fue digerida, lo que nos indica que ningún paciente porta la mutación *Ala 231Val*, (fig 15b).

**Exón 7
(Ala231Val)**

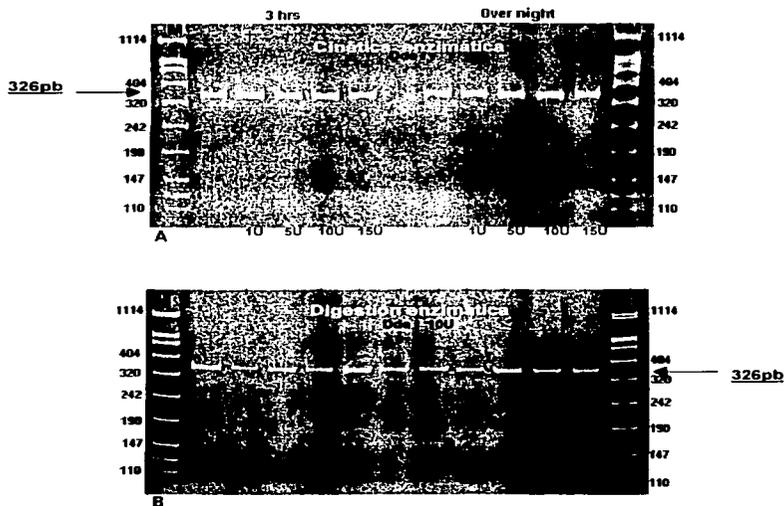


Fig 15. Geles de poliacrilamida al 8% a) cinética enzimática y b) resultados de la digestión enzimática del exón 7. Los carriles con signo (-) corresponden a productos sin digerir y los de signo (+) a los productos digeridos con la enzima de restricción Dde I.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Leu286Val, localizada en el *exón 8*, la mutación se debe al cambio de una C→G en el nucleótido 856, y resulta en la sustitución del aminoácido leucina por valina en el codón 286 que corresponde al HL V_I[10,18,36,44,79].

La presencia de esta mutación al igual que en el *exón 7* también genera un sitio de restricción, reconocido por la enzima Pvu II, que genera fragmentos de 93 y 122 pares de bases si la mutación es homocigota y de 93, 122 y 215 pares de bases, si se trata de una mutación heterocigota, por lo que la ausencia de productos de digestión nos indica un resultado normal, debido a que la enzima produce un corte, solo si existe la mutación (tabla 7). Los resultados de la cinética enzimática se muestran en la (fig 16a).

La digestión de los pacientes se realizó con 10U de enzima de restricción Pvu II, cantidad suficiente para digerir las muestras en caso de existir mutación, los resultados que se obtuvieron fueron normales en todas las muestras (215 pb). Los pacientes no presentaron la mutación analizada en este *exón* (fig 16b).

**Exón 8
(Leu286Val)**

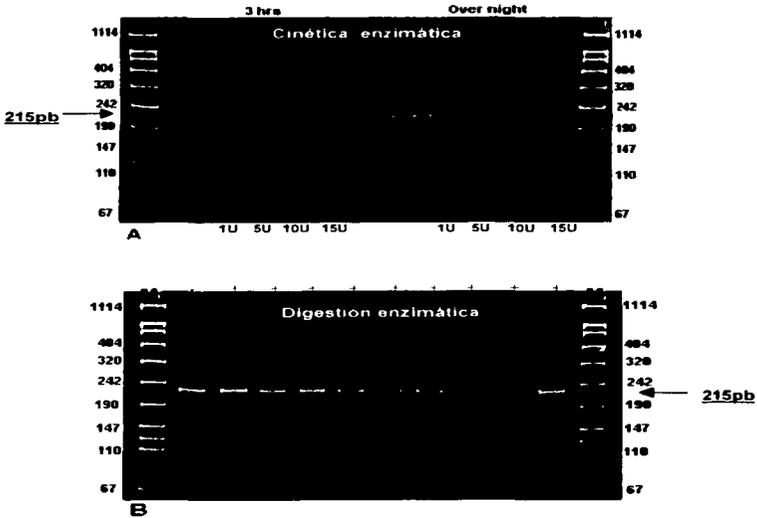


Fig 16. Geles de poliacrilamida al 8% a) cinética enzimática y b) resultados de la digestión enzimática del exón 8. Los carriles con signo (-) corresponden a productos sin digerir y los de signo (+) a los productos digeridos con la enzima de restricción Pvu II.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4 Hibridación en gota tipo Dot-blot del exón 11.

La mutación **Cys410Tyr** localizada en el exón 11 del gen PS1, se determinó utilizando la técnica de hibridación en gota tipo Dot-blot, esta mutación se debe al cambio de una G→A en el nucleótido 1229, causando la sustitución del aminoácido cisteína por tirosina en el codón 410 correspondiente al TM VI^[17,36,44,45,79].

Los resultados de este análisis se muestran en la figura 17a), en donde se observan todas las muestras hibridadas con el oligonucleótido silvestre y en la figura 17b), en la cual ninguna muestra se hibridó con el oligonucleótido mutado, estos resultados nos indican que la mutación **Cys410Tyr** no se encontró presente en ninguna de las 36 muestras analizadas para el exón 11.

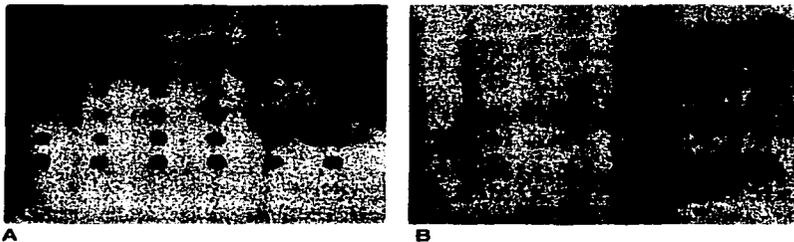


Fig 17. Autorradiografía de la hibridación en gota tipo Dot-blot, de las muestras del exón 11, a) hibridadas con el oligonucleótido silvestre y b) con el oligonucleótido mutado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5

Discusión

Los casos de EA de inicio temprano con un patrón de herencia autosómica dominante, corresponden solo al 5 % del total de enfermos de la población en general, este tipo de enfermedad se ha asociado a la presencia de mutaciones en 3 genes, el gen de PS1, PS2 y el gen para la APP, de los cuales las mutaciones en el gen de PS1 son responsables de cerca del 70 % de los casos^[7,10,16,18,44].

El descubrimiento de que las mutaciones en este gen causa la gran mayoría de los casos de EAF de inicio temprano, ha sido la razón por la que numerosas investigaciones se han enfocado hacia el estudio de este gen, como es el caso de este trabajo, en el que se analizaron cinco de las primeras mutaciones puntuales reportadas en la literatura las cuales han sido identificadas en varias familias de diversas poblaciones, entre las que destacan: La norteamericana, canadiense, alemana, japonesa, rusa, judía y caucásica^[7,10,17,18,35,36,44,45,79].

Aunque se ha reportado que el número de mutaciones en el gen de PS1 es más frecuente en los exones 5 y 8, en donde se estima se localizan aproximadamente el 65% de todas la mutaciones^[36,41], actualmente se sabe que las mutaciones en PS1 se encuentran distribuidas a lo largo de todo el gen y no se localizan en áreas determinadas^[17,47].

La metodología utilizada en este trabajo fue la necesaria para la identificación de las cinco mutaciones en estudio, pero los resultados fueron negativos en los 36 pacientes analizados. Sin embargo los pacientes presentan una demencia tipo Alzheimer y cumplen con los criterios clínicos para una probable enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano, por lo que los resultados no deben ser concluyentes para descartar la enfermedad, ya que no significan que los pacientes no porten otras mutaciones, si no que probablemente estén localizadas en otras regiones del gen no analizadas en este estudio o en alguno de los otros dos genes relacionados a este tipo de enfermedad, por lo que será necesario el empleo de otras técnicas para la identificación de otras posibles mutaciones.

En general las mutaciones en los tres genes son causas genéticamente raras de EA, esta baja frecuencia también podría explicar los resultados obtenidos, además de suponer que podrían existir otros genes aun no identificados, los cuales pudieran explicar las causas genéticas de la EA^[7,18,45].

La metodología que se utilizó en este estudio permitió hacer un tamizaje rápido de éstas mutaciones cuando no se cuenta con un secuenciador para poder analizar el gen completo. En caso de haber encontrado mutaciones la metodología empleada facilitaría su identificación, además de que hubiera sido necesario analizar controles sanos para poder comprobar si se trataba de una mutación patogénica o de un polimorfismo.

La importancia de los resultados obtenidos, es que al descartar la presencia de estas mutaciones, se plantea la posibilidad de estudiar otros sitios, tanto del mismo gen, como de los otros 2 genes involucrados. Estos resultados nos indican un fondo genético diferente para nuestra población, ya que mientras en otras poblaciones las mutaciones analizadas se encuentran con mayor frecuencia, en nuestra población están ausentes.

Actualmente en el INNN se está realizando la secuenciación completa del gen PS1 a los pacientes analizados en este trabajo, con el objetivo de identificar mutaciones en cualquier otra región del gen, así como también se tiene contemplado realizar la investigación en los otros dos genes, con la finalidad establecer el diagnóstico preciso de los pacientes y comprobar si existe un fondo genético diferente en nuestra población con respecto al resto de las poblaciones estudiadas y poder establecer los riesgos asociados a la enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano que siguen un patrón de herencia autosómico dominante, sin dejar de tomar en cuenta que pueden existir otras causas o factores no identificados que podrían estar relacionados a este tipo de enfermedad.

La identificación de mutaciones en el gen PS1 contribuye a la comprensión de los mecanismos celulares que conforman la patología de la EA. Entre los efectos patológicos de PS1 se encuentra el de modificar el procesamiento de la APP a partir de la cual se produce el péptido A β de 42 aminoácidos, principal sospechoso de ser el causante de la patología de la enfermedad, además de que se ha demostrado que son capaces de interferir con la respuesta a la apoptosis, lo que ha dado pie a la investigación de nuevos genes y vías responsables de la muerte celular neuronal^[36], todo esto es importante y contribuye a la investigación de nuevos tratamientos que podrían ser utilizados para algunos casos de EA. Actualmente los fármacos utilizados no son curativos, ni preventivos, solo disminuyen algunos de los síntomas^[10,36].

Las investigaciones recientes sobre las presenilinas indican un progreso considerable, sobre la identificación de vías y mecanismos que puedan representar nuevos blancos para la intervención terapéutica.

El reto es desarrollar una estrategia terapéutica efectiva para el beneficio de los pacientes con enfermedad de Alzheimer^[36].

6

Conclusiones

- ◆ Los pacientes estudiados no presentaron mutaciones en ninguno de los sitios analizados de los exones 5, 6, 7, 8 y 11 del gen de *Presenilina-1*. Sin embargo, los resultados no excluyen a los pacientes de tener enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano, puesto que al presentar las características clínicas de la enfermedad es probable que porten mutaciones en otros sitios del gen no analizados en este trabajo, ó en cualquiera de los otros dos genes relacionados con este tipo de enfermedad. No se descarta la posibilidad de la existencia de otros genes aún no identificados, los cuales podrían explicar las causas genéticas de la enfermedad de Alzheimer.

7

Anexos

7.1 Preparación de soluciones

Cloroformo Alcohol isoamílico (24:1)

Cloroformo	480 ml
Alcohol isoamílico	20 ml
Volúmen total	500 ml

Amortiguador para lisis de células rojas (BLCR)

MgCl ₂ 1 M	5 ml
NaCl 5 M	2 ml
Tris 1 M	10 ml
H ₂ O desionizada c.b.p	1000 ml

Amortiguador para lisis de células blancas (BLCB)

NaCl 5 mM	886 µl
SDS 10 %	46 µl
NaCl 7 M	308 µl

Se agregaron estas cantidades a cada botón de leucocitos.

Amortiguador para lisis de células blancas con proteinasa K

Tris	1 M (pH= 7.6)	1 ml
EDTA	0.5 M (pH=8.0)	2 ml
NaCl	5 M	1 ml
SDS	10%	2 ml
H ₂ O desionizada c.b.p		100 ml
Proteinasa K		200 µg/ml de amortiguador.

Solución amortiguadora Tris-Boratos-EDTA (TBE 10X)

Tris	108 gr
EDTA	9.3 gr
Acido bórico	55 gr
H ₂ O desionizada c.b.p	1000 ml

Se esterilizó en autoclave

Solución amortiguadora Tris-Boratos-EDTA (1X)

TBE 10X	100 ml
H ₂ O desionizada c.b.p	1000 ml

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Solución Salina de Citratos 20 X (SSC 20X)

NaCl	175.3 gr
Citrato de Sodio dihidratado	100.5 gr
Disolver en aproximadamente 800 ml de H ₂ O y ajustar el pH=7.0 con NaOH 10 N	
H ₂ O desionizada c.b.p	1000 ml
Se esterilizó en autoclave.	

Mezcla de SSC 2X y SDS 0.5%

SSC 20X	25 ml
SDS 10 %	12.5 ml
H ₂ O desionizada c.b.p	250 ml

Mezcla de SSC 2X y SDS 0.1 %

SSC 20 X	25 ml
SDS 10 %	2.5 ml
H ₂ O desionizada c.b.p	250 ml

7.2 Índice de figuras

FIGURA	PAGINA
Fig 1. a) Vía no amiloidogénica, b) Vía amiloidogénica.....	13
Fig 2. Hipótesis de la cascada amiloide.....	14
Fig 3. Asociación entre la proteína tau y las marañas neurofibrilares.....	17
Fig 4. Estructura y localización del gen PS1 en el cromosoma 14q24.3.	33
Fig 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína PS1.	34
Fig 6. Estructura de la proteína Presenilina-1.....	36
Fig 7. Procesamiento de la proteína Notch.....	41
Fig 8. Vía β -catenina	44
Fig 9. Complejo formado entre PS1 y Nicastrina.	46
Fig 10. Diagrama de flujo del método en general.....	55
Fig 11. Muestras de ADN en gel de agarosa al 1%	65
Fig 12. Gel de poliacrilamida al 8 %, que muestra los productos obtenidos por PCR, de los exones 5,6,7,8 y 11 del gen PS1.....	66
Fig 13. Geles de poliacrilamida al 8 %, a) cinética y b) digestión enzimática del exón 5.....	69
Fig 14. Geles de poliacrilamida al 8 %, a) cinética y b) digestión enzimática del exón 6.....	71
Fig 15. Geles de poliacrilamida al 8 %, a) cinética enzimática y b) resultados de la digestión enzimática del exón 7.....	73
Fig 16. Geles de poliacrilamida al 8 %, a) cinética enzimática y b) resultados de la digestión enzimática del exón 8.....	75
Fig 17. Autorradiografía de la hibridación en gota tipo Dot-blot, de las muestras del exón 11 a) hibridadas con el oligonucleótido normal y b) con el oligonucleótido mutado.....	76

7.3 Índice de tablas

TABLA	PAGINA
Tabla 1. Mutaciones puntuales en el gen de la APP humana.....	20
Tabla 2. Mutaciones puntuales en el gen de PS1 humana.....	22
Tabla 3. Mutaciones puntuales en el gen de PS2 humana.....	24
Tabla 4. Condiciones de reacción utilizadas para la amplificación de las muestras.....	59
Tabla 5. Programas de PCR utilizados.....	59
Tabla 6. Enzimas de restricción utilizadas para la búsqueda de las mutaciones en los exones 5,6,7 y 8 del gen PS1.....	61
Tabla 7. Mutaciones a identificar y productos obtenidos de la digestión enzimática, por la presencia o ausencia de sitios de restricción.....	67

7.4 Glosario

Afasia	Pérdida de la producción o comprensión del lenguaje hablado o escrito.
Agnosia	Incapacidad para reconocer o identificar objetos.
Alelo	Una, de dos o más formas alternativas de un gen, localizado en el sitio correspondiente.
β-amiloid	Péptido producido por el procesamiento anormal de la APP, es el mayor componente de las placas seniles, identificadas en los cerebros con enfermedad de Alzheimer.
Angiopatia	Cualquier enfermedad de los vasos sanguíneos.
Apoptosis	Proceso regulado que conduce a la muerte celular.
Apraxia	Deterioro de la capacidad de la ejecución de las actividades motoras.
Asa	En un segmento de ADN, es una región que se encuentra torcida o formando una horquilla.
Barrera Hematoencefálica	Barrera funcional entre la sangre y el parénquima del SNC, que evita el ingreso de moléculas grandes a las estructuras nerviosas superiores.
Caspasas	Comprenden una familia de proteasas, algunas de las cuales están involucradas con la apoptosis.
Centrómero	Porción de masa de cromatina situada en el interior de un cromosoma, se adhiere al huso acromático durante la división celular, su posición es constante en cada cromosoma.
Cinetocoro	Estructura proteica de tres capas ubicada en el centrómero de cada cromosoma mitótico.
Citosol	Fase acuosa del citoplasma, en donde se localizan los organelos, excluyendo los compartimientos.
Clon	Población de células o moléculas idénticas, que descienden de un mismo progenitor.
Codón	Triplete de tres nucleótidos en el ADN o ARNm, que codifica para un aminoácido.

Corteza cerebral	Delgada capa de sustancia gris, que reviste la superficie de los hemisferios cerebrales.
Deleción	Pérdida de una secuencia de ADN en un cromosoma.
Enzima de restricción	Cualquier enzima que reconoce y corta un sitio específico en las moléculas de ADN bicatenario.
Estrés celular	Estímulo de intensidad suficiente para producir el desequilibrio de los mecanismos reguladores homeostáticos normales.
Exón	Segmento de un gen que se transcribe a ARNm y posteriormente se traduce a una secuencia de aminoácidos.
Fenotipo	Características visibles de una célula u organismo.
Fibroblastos	Tipos de células del tejido conectivo que secretan colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, migran y proliferan durante la cicatrización de heridas y en cultivos de tejido.
Fosforilación	Reacción en la cual un grupo fosfato queda unido covalentemente a otra molécula.
Gen	Segmento de ADN que incluye exones, intrones y regiones transcritas no codificantes, necesarias para la producción de una determinada cadena de polipéptido.
Genotipo	Constitución genética de una célula u organismo.
Heterocigoto	Célula u organismo diploide que contiene dos alelos diferentes de un gen particular.
Hibridación	Proceso mediante el cual dos cadenas complementarias de ADN forman una doble hélice, durante un periodo de unión. Técnica para detectar secuencias de nucleótidos determinados.
Hipocampo	Región del cerebro relacionada con la memoria reciente, el aprendizaje y las reacciones emocionales.
Homocigoto	Célula u organismo diploide que posee dos alelos idénticos de un gen particular.

Knockout	Modelos animales que nacen como consecuencia de una serie de procedimientos experimentales y que carecen de un gen funcional que normalmente deben poseer.
Ligando	Cualquier molécula distinta del sustrato de una enzima que se fija específicamente a una proteína.
Locus	Posición específica de un gen en un cromosoma.
Lumen	Espacio interior que encierra un considerable volumen entre los compartimientos unidos por membranas.
Marañas neurofibrilares	Formaciones anormales localizadas intraneuronalmente, compuestas básicamente de proteína tau anormalmente fosforilada.
Mutación	Cambio espontáneo en la secuencia del ADN genómico, que altera de manera permanente y provoca un cambio hereditario.
Mutación puntual	El cambio de una base por otra en un segmento de ADN.
Nucleótido	Molécula compuesta por una base (púrica o pirimídica), una pentosa (ribosa o desoxirribosa) y un grupo fosfato.
Oligonucleótido (primer)	Segmento de ADN que forma pares de bases con una hebra patrón complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con la finalidad de copiar la hebra patrón.
Parálisis	Debilidad que puede resultar de una interrupción en la vía motora, localizada en cualquier lugar entre la corteza cerebral y las fibras contráctiles de un músculo.
Paraparesia espástica	Desarrollo de debilidad y parálisis parcial de las piernas, acompañado de movimientos involuntarios.
Placas seniles	Depósitos extracelulares compuestos básicamente por el péptido β -amiloide, localizados en mayor cantidad en los cerebros con enfermedad de Alzheimer.
Polimorfismo	Presencia de dos o más alelos en una población.
Proteasa	Enzima que degrada proteínas.

Proteasoma	Complejo de proteasa multifuncional de gran tamaño localizado en el citosol, que degrada las proteínas intracelulares marcadas para la destrucción, mediante la adhesión de múltiples moléculas de ubiquitina.
Proteína integral de membrana	Cualquier proteína ligada a membrana, en su totalidad o en parte.
Proteólisis	Degradación de una proteína.
Sinapsis	Región entre la terminal axónica de una neurona y una célula nerviosa.
Sistema Nervioso Central	La parte del sistema nervioso de los vertebrados que compone el encéfalo y la médula espinal. El principal órgano procesador de la información
Somitogénesis	Proceso que da origen a las vértebras durante el desarrollo embrionario.
Sonda	Fragmento de ADN o ARN con marca radiactiva o química, utilizada para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos por hibridación.
Splicing	Proceso mediante el cual se remueven los intrones y los exones se unen para formar un ARNm.
Tau	Proteína asociada a los microtúbulos, es el mayor componente de las marañas neurofibrilares presentes en los cerebros con EA.
Telómero	Región terminal de un cromosoma.
Transfección	En células eucarióticas, es la adquisición de nuevos marcadores genéticos, por incorporación de ADN.
Transgénico	Modelo animal o vegetal que incorpora en su genoma genes provenientes de otro organismo y que es capaz de transmitir estos genes a su descendencia.
Ubiquitinación	Proceso en el que la proteína ubiquitina se une mediante enlaces covalentes a restos de lisina de otras proteínas intracelulares. Las proteínas a las que se agrega una molécula de ubiquitina suelen ser degradadas en el proteasoma.

8

Referencias

- 1.- Alonzo Vilatela M E y Yescas Gómez Petra. Genética de la Enfermedad de Alzheimer. Revista de Investigación Clínica. 1998; 50: 155-162.
- 2.- Pichot M. et al. Manual de Diagnóstico y estadística de los trastornos mentales. Masson S.A. 1996; 138-151.
- 3.- Krassoievitch M. Demencia Presenil y senil, ed Salvat Mexicana S.A de C.V. Departamento de Psiquiatría y Salud Mental, Fac de Medicina UNAM 1997; 3-12, 130.
- 4.- García Cacabelos R. Enfermedad de Alzheimer. Etiopatogenia, Neurobiología y Genética Molecular. Diagnóstico y Terapéutica. De Prous Editores. Barcelona España 1991; 16,59-65.
- 5.- Alberca R. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Ed Panamericana. España. 1998; 26,82-84,150,152-155,170-176.
- 6.- Mena López Raúl, García Sierra Francisco. Bases neuropatológicas y moleculares de la Enfermedad de Alzheimer. Archivos de Neurociencias. 1998; 3(3):164-173.
- 7.- Cruts Marc, et al., Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and 2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. Human Molecular Genetics. 1998; 7(1): 43-51.
- 8.- Kaplan Harold I, Sadock Benjamin J, Grebb Jack. A. Sinopsis de Psiquiatría. Ciencias de la conducta. Psiquiatría Clínica. 7ª edición. Ed Panamericana. Argentina. 1997; 358-369.
- 9.- Jeffrey L, Cummings, Greg Cole. Alzheimer Disease. Journal American Medical Association. 2002; 287(18): 2335-2338.
- 10.- Lendon L. et al., Exploring the Etiology of Alzheimer Disease Using Molecular Genetics. Journal American Medical Association. 1997; 277(10): 825-836.
- 11.- Gómez Cabrera José A, López Saura Pedro. Interferon alfa y Enfermedad de Alzheimer. Archivos de Neurociencias. 2000; 5(2):65-73.
- 12.- St George-Hyslop Peter H. Piecing Together Alzheimer's. Scientific American. 2000; 283(6):76-83.
- 13.- Marx Jean. New leads on the 'How' of Alzheimer's. Science. 2001;293(5538):2192-2194.
- 14.- Pérez Tur J. La Genética y la Enfermedad de Alzheimer. Revista de Neurología. 2000; 30(2):161-169.

- 15.- Pericak-Vance Margaret A, et al., Complete Genomic Screen in late-onset Familial Alzheimer Disease. Journal American Medical Association. 1997; 298(15):1237-1241.
- 16.- Shen Jie, et al., Skeletal CNS defects in Presenilin-1-Deficient Mice. Cell. 1997; 89:629-639.
- 17.- Poorkaj Parvoneh, et al., Missense mutations in the chromosome 14 Familial Alzheimer's disease Presenilin 1 gene. Human Mutation. 1998; 11:216-221.
- 18.- Cruts Marc and Van Broeckhoven Christine. Presenilin Mutations in Alzheimer Disease. Human Mutation. 1998; 11: 183-190.
- 19.- Tang M.X, et al., Incidence of AD in African-Americans, Caribbean Hispanics, and Caucasians in northern Manhattan. Neurology. 2001; 56:49-56.
- 20.- Johnson KA, et al., Presenilin-1 associated abnormalities in regional cerebral perfusion. Neurology. 2001; 56:1545-1551.
- 21.- Hardy John and Selkoe Dennis.J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. Science. 2002; 297(5580):353-356.
- 22.- Lewis Jada, et al., Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP. Science. 2001 293(5534):1487-1491.
- 23.- Götz J. Chen F. Dorpe Van J. Nitsch RM. Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A β Fibrils. Science. 2001; 293(5534):1491-1494.
- 24.- Russo C, et al., Molecular consequences of presenilin-1 mutation. Nature. 2001(411) : 654-655.
- 25.- Ferber Dan. Using the Fruit Fly to Model Tau Malfunction. Science. 2001; 292(5524):1983-1984.
- 26.- Esler William P. and Wolfe Michael S. A Portrait of Alzheimer Secretases. New Features and Familial Faces. Science. 2001; 293(5534): 14491454.
- 27.- Dekosky Steven. T. Neurobiología y biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. Revista de Neurología. 2002; 35: 752-760.
- 28.- Smith Mark A. Amyloid-beta and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain. Free Radical Biology and Medicine.2002;33(9): 1194-1199.
- 29.- Roger N. Rosenberg, MD. The molecular and genetic basis of AD: The end of the beginning. The 2000 Wartenberg lecture. Neurology. 2000; 54: 2045-2054.

- 30.- Vassar Robert. β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. Science. 1999; 286: 735-741.
- 31.- Tandon Anurag. Molecular genetics of Alzheimer's: the role of β -amyloid and the presenilins. Current Opinion in Neurology. 2000; 13: 377-384.
- 32.- Hong Lin, et al., Structure of the Protease Domain of Memapsin 2 (β -Secretase) Complexed with Inhibidor. Science. 2000; 290(5489): 150-153.
- 33.- Trelles Montero Luis. La inflamaci3n en la Enfermedad de Alzheimer. Revista de Neuro-Psiquiatr3a. 1999; 62: 183-188.
- 34.- S3nchez M.P, Alvarez Tallada V, Avila J. La prote3na tau en enfermedades neurodegenerativas. Tautopat3as. Revista de Neurolog3a. 2001; 33(2): 169-177.
- 35.- Rogaeva E.A, et al., Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases 21 Novel mutations. Neurology. 2001; 57: 621-625.
- 36.- Czech Christian, Tremp G3nter, Pradier Laurent. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. Progress in Neurobiology. 2000; 60: 363-384.
- 37.- Prote3nas Anormales en la Enfermedad de Alzheimer. Revista de divulgaci3n Cient3fica y Tecnol3gica de la asociaci3n Ciencia hoy. 1997; 7(41):
- 38.- Queralt R, et al., Detecci3n de the presenilin 1 gene mutation (M139T) in early-onset familial Alzheimer disease in Spain. Neuroscience Letters. 2002; 299: 239-241.
- 39.- Queralt R, et al., A novel mutation (V89) in the presenilin 1 gene in a family with early onset Alzheimer's disease and marked behavioural disturbances. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2000; 72:266-269.
- 40.- Fraser Paul E, et al., Presenilin structure, funtion and role in Alzheimer disease. Biochimica et Biophysica Acta. 2000; 1502: 1-15.
- 41.- Sorbi Sandro, et al., Genetic risk factors in familial Alzheimer's disease. Mechanisms of Agein and Development. 2001; 122: 1951-1960.
- 42.- Selkoe Dennis J, et al., Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98(20): 11030-11041.
- 43.- Kimura Nobuyuki, et al., Age-related changes in the localization of presenilin-1 in cynomolgus monkey brain. Brain Research. 2001; 922: 30-41.
- 44.- Sherrington R, et al., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature. 1995; 395: 754-760.

- 45.- Alzheimer's Disease Collaborative Group. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. Nature. 1995; 11: 219-222.
- 46.- Russo C, et al., Presenilin 1 mutations in Alzheimer's disease. Nature. 2000; 405: 531-532.
- 47.- Pérez Tur J. Presenilinas en la génesis de la enfermedad de Alzheimer. Revista de Neurología. 2001; 33(10): 967-972.
- 48.- Haass Christian and De Strooper Bart. The Presenilins in Alzheimer's Disease- Proteolysis Holds the key. Science. 1999; 286: 916-919.
- 49.- Maestre Gladys, et al., Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease: Ethnic Variation in Genotypic Risks. American Neurological Association. 1995; 37: 254-259.
- 50.- Hashimoto M, et al., Apolipoprotein E ϵ 4 and the pattern of regional brain atrophy in Alzheimer's disease. Neurology. 2001; 57: 1461-1466.
- 51.- Borenstein Graves A, et al., Head circumference and incident Alzheimer's disease Modification by apolipoprotein E. Neurology. 2001; 57: 1453-1460
- 52.- Ihara Y, et al., Relationship between oxidative and apoE phenotype in Alzheimer's disease. Acta Neurol Scand. 2000; 102: 346-349.
- 53.- Tanzi Rudolph E. And Bertram Lars. New Frontiers in Alzheimer's Disease Genetics. Neuron. 2001; 32: 181-184.
- 54.- Dartigues Jean Francois and Letenneur Luc. Genetic epidemiology of Alzheimer's disease. Current Opinion in Neurology. 2000; 13: 385-389.
- 55.- Bertram Lars, et al., Evidence for Genetic Linkage of Alzheimer's Disease to chromosome 10q. Science. 2000; 290(5500): 2302-2303.
- 56.- Ertekin-Taner Nilufer, et al., Linkage of plasma A β 42 to a quantitative locus on chromosome 10 in late-onset Alzheimer Disease pedigrees. Science. 2000; 290(5500): 2303-2304.
- 57.- Myers Amanda, et al., Susceptibility locus for Alzheimer's Disease on chromosome 10. Science. 2000; 290(5500): 2304-2305.
- 58.- Checler Frédéric. Presenilins. Structural Aspects and Posttranslational Events. Molecular Neurobiology. 1999; 19(3): 255-265.
- 59.- Ponting Chris P, et al., Identification of a novel family of presenilin homologues. Human Molecular Genetics. 2002; 11(9): 1037-1044.

- 60.- Herreman An, et al., Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. Cell Biology. 1999; 96(21): 11872-11877.
- 61.- Leissing Malcolm A. Subcellular Mechanisms of Presenilin-Mediated Enhancement of Calcium Signaling. Neurobiology of Disease. 2001; 8: 469-478.
- 62.- Annaert Wim and De Strooper Bart. Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. Trends in Neurosciences. 1999; 22: 439-443.
- 63.- Sangram S. Sisodia, Seong H. Kim, and Gopal Thinakaran. Function and Dysfunction of the Presenilins. American Journal Human Genetics. 1999; 65: 7-12.
- 64.- Wittenburg Nicole, et al., Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in C. elegans. Nature. 2000; 406: 306-309.
- 65.- Song Schaochuen, et al., Proteolytic processing and degradation of human presenilin-1 expressed in yeast. Neuroscience Letters. 2000; 282: 65-68.
- 66.- Kulic Luka, et al., Separation of presenilin function in amyloid β -peptide generation and endoproteolysis of Notch. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000; 97(11): 5913-5918.
- 67.- Mizutani Tomohiko, et al., Conservation of biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members. Proc Natl Acad Sci. USA. 2001; 98(16):9026-9030.
- 68.- Levitan Diane, et al., PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that function in APP processing and Notch signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98(21): 12186-12190.
- 69.- Doerfler Petra. Presenilin-dependent γ -secretase activity modulates thymocyte development. Proc. Natl. Acad. USA. 2001; 98(16): 9312-9317.
- 70.- Li Yue-Ming, et al., Photoactivated γ -secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. Nature. 2000; 495: 689-693.
- 71.- Murphy Paul M, et al., FAD-linked mutations in presenilin 1 alter the length of A β peptides derived from β APP transmembrane domain mutants. Biochimica et Biophysica Acta. 2002; 1586:199-209.
- 72.- Yu Gang, et al., Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. Nature. 2000; 407: 48-54.
- 73.- Orlacchio Antonio, et al., Association analysis between Alzheimer's disease and the Nicastrin gene polymorphisms. Neuroscience Letters. 2002; 33: 115-118.

- 74.- Schenk Dale. Alzheimer's disease: A partner for presenilin. Nature. 2000; 407: 34-35.
- 75.- Kaether Christoph, et al., Presenilin-1 affects trafficking and processing of β APP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. The Journal of Cell Biology. 2002; 158(3): 551-561.
- 76.- Annaert Wim G, et al., Interaction with Telencephalin and the Amyloid Precursor Protein Predicts a Ring Structure for Presenilins. Neuron. 2001; 32: 579-589.
- 77.- Leissring Malcolm A, et al., Calsenin reverses presenilin-mediated enhancement of calcium signalling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97(15): 8590-8593.
- 78.- Yasuda Yuka, et al., FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002; 296: 313-318.
- 79.- Ramirez Dueñas M.G, et al., A novel Leu171Pro Mutation in Presenilin-1 gene in a mexican family with early onset Alzheimer disease. Annales de Génétique. 1998; 41(3): 149-253.
- 80.- Sambrook, Fritsch and Maniatis. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratoty Press. U.S.A 1989; 98-106, 150-177 y387-389.
- 81.- Lonard G. et al., Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier, U.S.A 1986; 51-61, 115-118, 147-149, 264-267 y 320-323.
- 82.- Lodish Harvey, et al., Biología Celular y Molecular. 4ª edición. Ed Panamericana. Madrid España 2002.
- 83.- Karp Gerald. Biología Celular y Molecular. McGram-Hill Interamericana.México D.F. 1998.
- 84.- Junqueira Carnero. Biología Celular y Molecular. 6ª edición. McGram-Hill Interamericana. Santiago de Chile. 1998.
- 85.- Lewin Benjamín. Genes VII. Oxford University press. U.S.A. 2000.
- 86.- Bruce Alberts, et al., Biología Molecular de la Célula. 3ª edición. Omega. Barcelona España. 1996.
- 87.- Bennington James L. Diccionario Enciclopédico del Laboratorio Clínico. Ed Panamericana. Buenos Aires Argentina. 1991.