



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**BÚSQUEDA DE VARIANTES GÉNICAS EN *PSEN1* Y *GRN*
EN PACIENTES CON DEMENCIA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

EDGAR SANDOVAL CORDERO



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

VOCAL: **Profesora:** MARÍA BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO

SECRETARIO: **Profesora:** PETRA YESCAS GÓMEZ

1er. SUPLENTE: **Profesora:** TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

2° SUPLENTE: **Profesora:** SILVIA KARINA GODÍNEZ PALMA

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”.

PETRA YESCAS GÓMEZ
ASESOR DEL TEMA

NANCY MONROY JARAMILLO
SUPERVISOR TÉCNICO

EDGAR SANDOVAL CORDERO
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS.

A la Doctora María Elisa Alonso Vilatela, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto así como el apoyo que me ha brindado.

A mi tutora, la Doctora Petra Yescas Gómez por aceptarme en el laboratorio, por sus valiosas enseñanzas y consejos que me ha dado a lo largo de la realización de mi tesis.

A la Doctora Nancy Monroy por sus valiosos consejos y observaciones que me han ayudado a fortalecer mis conocimientos.

A los integrantes de mi jurado por su buena disposición y valiosos comentarios.

A Andrea por todo su cariño y amor, por estar allí en los momentos más importantes y siempre brindarme su apoyo.

A mi compañeros y amigos del laboratorio por sus consejos ayuda, sus valiosos consejos y su agradable compañía.

A todos mis amigos con los cuales he vivido grandes momentos de mi vida, que me han apoyado cuando más lo he necesitado y con los cuales siempre puedo confiar.

A todas las personas que he conocido a lo largo de mi trayectoria, que de alguna manera me han hecho crecer y madurar.

A mis abuelitos, tíos y tías por haberme brindado todo su cariño, apoyo y todos los invaluable consejos.

DEDICATORIAS.

A mi familia que con todo su apoyo y cariño ha hecho esto posible:

A ti mamá: Que por tu fortaleza, perseverancia y tu muy especial manera de ver la vida he a prendido a luchar por lo que quiero, viendo siempre hacía delante con un gran optimismo.

A ti papá: Por todas las cosas que me has enseñado y que han formado mi carácter, por todo tu cariño y esfuerzo que has hecho para que pudiera llegar hasta aquí.

A ti hermano: Por estar conmigo, por todos los grandes momentos que hemos pasado, así como todos los consejos que me has dado y sobre todo por compartirme tu manera de ver la vida.

A todos Ustedes los Amo como a nadie.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	4
II. RESUMEN.....	6
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
2.2 HIPÓTESIS.....	9
2.3 OBJETIVOS.....	9
III. MARCO TEÓRICO.....	10
3.1 CONCEPTO DE DEMENCIA.....	10
3.2 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	11
3.2.1 Epidemiología	11
3.2.2 Clasificación de la EA.....	12
3.2.3 Características Clínicas.....	13
3.2.5 Etiología y factores de riesgo.....	15
3.2.5.1 Factores de riesgo genéticos.....	17
3.2.5.2 Apolipoproteína E.....	17
3.2.6 Patogenia.....	18
3.2.6.1 Producción del Péptido β -amiloide.....	18
3.2.6.2 Cascada amiloide.....	20
3.2.6.3 Mecanismo de la proteína tau en la EA.....	22
3.2.7 GENÉTICA DE LA EA.....	23
a) Proteína Precursora Amiloide.....	24
b) Presenilina 1.....	25
c) Presenilina 2.....	26
3.2.8 PRESENILINA 1.....	27
3.2.8.1. Estructura y localización del gen.....	27
3.2.8.2. Topología y estructura de la proteína PSEN1.....	28
3.2.8.3. Conservación entre especies.....	29
3.2.8.4. Localización y expresión.....	29
3.2.8.5. Degradación y Procesamiento.....	30
3.2.8.6. Funciones biológicas.....	31

a) Vía de señalización Notch.	31
b) Vía β -catenina.	32
c) Presenilina 1 en el complejo γ -secretasa.....	33
3.2.8.7. Función patológica.	35
3.3. DEMENCIA FRONTOTEMPORAL.	37
3.3.1. EPIDEMIOLOGÍA.	37
3.3.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.	37
3.3.3. CARACTERÍSTICA NEUROPATOLÓGICAS.....	38
3.3.4. ETIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA DEMENCIA FRONTOTEMPORAL.....	40
3.3.4.1 GRN.....	41
3.3.4.2. MAPT.....	42
3.3.4.3. VCP.....	42
3.3.4.4 CHMP2B.....	42
3.3.4.5. C9orf72.....	43
3.3.5. GRN.....	43
3.3.5.1. Funciones biológicas de PGRN.	45
a) Función de PGRN en el Sistema Nervioso Central.....	45
b) Neuroinflamación.	45
3.3.5.2. Mutaciones en GRN.....	46
IV. DISEÑO EXPERIMENTAL.	48
V. RESULTADOS.	58
5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.	58
5.2 CUANTIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO.	59
5.3 ANÁLISIS DEL DNA GENÓMICO.	60
5.4 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR.	61
5.5 MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN PSEN1.	63
5.6 MUTACIONES ENCONTRADAS EN EL GEN GRN.....	67
VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	69
VII. CONCLUSIONES.....	73
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	74

IX. APÉNDICE.....	91
A. REACTIVOS.....	91
B. EQUIPOS Y MATERIALES.....	92

I. Abreviaturas.

3R	Tres repetidos
4R	Cuatro repetidos
a.a	Aminoácido.
A β	Péptido β -amiloide
AN	Ácido Nítrico
AD	Autosómico dominante
APOE	Apolipoproteína E
A β 40	Péptido β amiloide de 40 aminoácidos
A β 42	Péptido β amiloide de 42 aminoácidos
BACE-1	Enzima de anclaje al sitio β de la PPA
BLGR	Buffer de lisis de glóbulos rojos
<i>CHMP2B</i>	Gen que codifica a la proteína multivesicular
DFT	Demencia Frontotemporal
DFT-TAU	Demencia frontotemporal con inclusiones tau
DFT-U	Demencia frontotemporal compuesta por ubiquitina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Enfermedad de Alzheimer
ERO	Especie reactiva de oxígeno
FUS	Proteína Fusionada a Sarcoma
g	Gramo
<i>GRN</i>	Gen de la progranulina
GSH	Glutación peroxidasa
KD	Kilo Dalton
M	Molaridad
MP	Marcador de eso molecular
mM	Micro molar
<i>MAPT</i>	Gen de la proteína asociada a microtúbulos
μ L	Microlitro
NICD	Dominio intracelular de Notch

nm	Nanómetro
NFT's	Marañas de neurofibrillas.
pb	Pares de base
PGRN	Proteína del gen Progranulina
<i>PPA</i>	Gen de la Proteína Precursora del β amiloide
PPA	Proteína Precursora del β Amiloide
ProNFG	Factor de crecimiento pro-nervio
<i>PSEN1</i>	Gen de la Presenilina-1
<i>PSEN2</i>	Gen de la Presenilina-2
Rpm	Revoluciones por minuto
SLPI	Secreción de proteasa leucocítica
$sPPA_{\alpha}$	Fragmento alfa soluble no amiloidogénico
$sPPA_{\beta}$	Fragmento beta soluble
TCF	Factor de transcripción Celular
TDP-43	DFT con inclusiones tau negativas y TDP-43 positivas
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TNF	Factor de necrosis tumoral
<i>VCP</i>	Gen que codifica a la proteína que contiene valosina

II. Resumen.

De 1990 a la fecha la esperanza de vida de los mexicanos, ha pasado de los 70 a los 75 años. En parte, esto se debe al, desarrollo de nuevos tratamientos médicos y farmacológicos ocasionando un incremento de la población adulta mayor. Actualmente en países en desarrollo como el nuestro, los padecimientos como la demencia de tipo Alzheimer y la demencia frontotemporal se ven incrementados al crecer la población de adultos mayores. Esto trae como consecuencia, que las demencias sean consideradas un problema de salud pública.

Este proyecto pretende ampliar los conocimientos sobre las 2 principales causas de demencias: la enfermedad de Alzheimer (EA) y la demencia frontotemporal (DFT).

La enfermedad de Alzheimer se divide en dos tipos dependiendo de la edad de inicio: EA de inicio tardío (después de los 60 años) y EA de inicio temprano (antes de los 60 años) y también se clasifica por la presencia de antecedentes familiares. La mayoría de los casos son esporádicos, pero menos del 5% de los casos muestran un patrón de herencia autosómico dominante (AD). A pesar de que son poco frecuentes estas formas familiares, en ellas se han descrito mutaciones en 3 genes *PPA*, *PSEN 1* y *PSEN 2*. De ellos, las mutaciones en el gen de la *Presenilina 1 (PSEN1)* explican más del 50% de los casos de inicio temprano, comparados con *PSEN 2* (1%) y *PPA* (5%). *PSEN 1* se localiza en el cromosoma 14q24.2, está conformado de 12 exones, y en él se han descrito 216 mutaciones.

En la DFT, también la mayoría de los casos son esporádicos, pero cerca del 10% tienen una historia familiar positiva, que sugiere un patrón de herencia AD. Existen dos genes involucrados, que pueden explicar la mayoría de los casos familiares. Estos genes se localizan en el cromosoma 17 y se denominan: la proteína tau asociada a microtúbulos (*MAPT*) y progranulina (*GRN*). En ellos se han identificado 73 y 114 mutaciones respectivamente. En conjunto estas mutaciones explican 10-25% de casos esporádicos y 5-20% de formas familiares de DFT. Sin embargo, es difícil determinar el número de casos con herencia AD debido a la

penetrancia incompleta, desconocimiento de historia familiar y errores diagnósticos.

En este estudio la búsqueda de mutaciones se llevó a cabo en el gen *PSEN1* y *GRN* por medio de secuenciación directa.

Se analizaron 44 pacientes con probable diagnóstico de demencia tipo Alzheimer y 16 muestras con probable diagnóstico de demencia frontotemporal, los cuales fueron enviados al departamento de Genética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez.

Nueve casos con EA presentaron mutación en *PSEN1*: En ocho pacientes se identificó la mutación A431E en el exón 12 y en uno se encontró la mutación F388L en el exón 11. Mientras que solo un caso con DFT presento mutación en *GRN*, en donde se identificó una inserción en el exón 2 (p.Cys31fs).

2.1 Planteamiento del problema

Hasta el momento el conocimiento de los mecanismos que llevan al desarrollo de las demencias aún permanece inconcluso, a pesar de que se han identificado diferentes factores tanto genéticos como ambientales, por lo que aún no se ha encontrado una cura para estas enfermedades, ni nada que detenga su progresión

El diagnóstico de los diferentes tipos de demencia basado solamente en las características clínicas es difícil, se requiere del abordaje que ofrece el análisis molecular en los genes descritos para estas enfermedades o para la identificación de nuevas variantes que mejoren el conocimiento de estos padecimientos. El realizar un diagnóstico de certeza, no solo permite un mejor abordaje clínico en el tratamiento y manejo del paciente, si no que abre la posibilidad de un diagnóstico presintomático, y de esta manera poder establecer los riesgos para la descendencia y dar un mejor asesoramiento genético a estas familias.

La utilidad de este estudio es para conocer las diferentes variaciones y su prevalencia en los genes *PSEN1* y *GRN* en pacientes mexicanos, así como brindar una mejor idea de los posibles mecanismos por los cuales se desarrollan dichas enfermedades en nuestra población.

2.2 Hipótesis.

En base a los reportes en la literatura con respecto a la etiología de las enfermedades, se espera que un 20% por ciento de los pacientes con EA presenten mutaciones en el gen *PSEN1*, mientras que los pacientes con DFT presenten mutaciones en el gen *GRN*.

2.3 Objetivos.

- Identificar mutaciones en los exones 4 al 12 del gen *PSEN1* en pacientes mexicanos que presente demencia de tipo Alzheimer hereditaria mediante secuenciación directa.
- Identificar mutaciones en los 12 exones del gen *GRN* en pacientes mexicanos que presente demencia Frontotemporal mediante secuenciación directa.

III. Marco teórico.

3.1 Concepto de demencia.

El término de demencia ha sido usado desde los antiguos griegos, esta palabra deriva del latín “demens” que significa demente. Durante el periodo Greco-Romano (930 – 210 AD) se realizaron los primeros intentos por clasificar a las demencias que fueron identificadas en los ancianos, como un desorden mental. [1,2]

En el siglo XIX la demencia fue descrita como un estado adquirido en el que se muestra un déficit intelectual, que se puede dar a cualquier edad y bajo cualquier circunstancia. La demencia de tipo senil se empezó a diferenciar de otras gracias a los estudios de Pinerl y Esquirrol. [1]

Actualmente se dice que la demencia es un término genérico que describe una disfunción crónica o progresiva de la corteza cerebral o subcortical, que lleva al decaimiento intelectual, así como una disminución en la orientación espacial, en la toma de decisiones, en el juicio y en el razonamiento abstracto, lo que conduce a un cambio de humor, de comportamiento, de personalidad del individuo y esto no debe de ser considerado como parte normal del envejecimiento. [3, 4, 6]

La demencia afecta del 5-20% de la población adulta mayor (mayor a los 65 años). La incidencia incrementa con la edad, y ésta se duplica cada 5 años, cuando las personas son mayores de 60 años. [4, 5, 6, 8].

El modo para clasificar a las demencias, es en base a la proteína que se ve afectada durante la patogénesis. En la Tabla 1 se muestran las demencias hereditarias de acuerdo a esta clasificación.

Tabla 1. Demencias Hereditarias. Tomada y modificada de Warner, ThomasT. Hammas: Simon R. [3]

Enfermedad	Gen
Amiloidopatías	
EA esporádica	<i>Apo E</i>
EA de tipo familiar Taupatías	<i>Proteína Precursora del β amiloide (PPA), Presenilina-1, Presenilina-2.</i>
DFT con parkinsonismo	<i>Proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT)</i>
DFT	<i>CHMP2B</i>
Otras demencias.	
DFT tau negativa	<i>Progranulina (GRN)</i>

La causa más común de demencia es la enfermedad de Alzheimer (EA), ya que comprende del 50-70% de todos los casos reportados seguida de la Demencia Frontotemporal (DFT), que comprende alrededor del 50% de todos los casos de demencia en pacientes menores a los 60 años. [7].

3.2 Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita en 1906 por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer y su colaborador, el físico italiano Gaetano Perusinui, la cual se identificó en una mujer de 50 años, llamada Aguste D que cursaba con una demencia progresiva. Esta enfermedad se caracteriza clínicamente, por un decaimiento progresivo en las habilidades cognitivas, así como una distorsión en el juicio, en la toma de decisiones y en la orientación espacial. [1]

3.2.1 Epidemiología

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a más de 26 millones de personas alrededor del mundo, se predice que este número de casos puede llegar a 115 millones para el año 2030, si no se encuentra un tratamiento eficiente. Esta

enfermedad es la causa más común de demencia con una prevalencia del 4.4% en personas de 65 años y del 22% en personas con 90 años o más. [9, 10]

3.2.2 Clasificación de la EA.

La forma en la que la EA se clasifica, es de acuerdo a su edad de inicio:

- EA de Inicio Temprano: Cuando los síntomas aparecen antes de los 65 años, y representa del 1-5% de todos los casos.[11, 12, 13, 14]
- EA de Inicio tardío: Los síntomas aparecen después de los 65 años y representa del 95 – 99% de todos los casos. [11, 12, 13, 14]

Otra manera en la que los casos de EA pueden clasificarse, es de acuerdo a la historia familiar, estos pueden ser autosómicos dominantes (representan menos del 5% de los casos), familiares (representan del 15–25% de los casos) o esporádicos (representan aproximadamente el 75% de los casos) [11]. Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de la EA de acuerdo al Colegio Americano de Genética Médica. Tomada y modificada de Alves L., et al. [11]

Historia familiar	Clasificación	Definición.
Positiva	Autosómico dominante (<5%)	La enfermedad afecta al menos 3 individuos en 2 o más generaciones, siendo 2 de los individuos parientes de primer grado del tercero.
	Familiar (~15-25%)	La enfermedad afecta a más de un individuo y al menos 2 de los individuos son parientes de tercer grado.
Negativa	Esporádico (~75%)	Es un caso aislado en la familia, o que se encuentra separado por más de 3 generaciones.

Actualmente se han encontrado 3 genes, que se asocian con la forma autosómica dominante de la EA de inicio temprano, los cuales son: el gen de la *Proteína Precursora del β Amiloide (PPA)* localizado en el cromosoma 21, el gen de la

Presenilina-1 (PSEN1) localizado en el cromosoma 14 y el gen de la *Presenilina-2 (PSEN2)* localizado en el cromosoma 1. [11, 12, 13,14, 15]

Se ha encontrado un factor de susceptibilidad en las formas familiares de inicio tardío y esporádicas, este es el alelo $\epsilon 4$ del gen la *Apolipoproteína E (APOE)*, considerado con un factor de riesgo para la enfermedad. [11, 12,14, 15]

3.2.3 Características Clínicas.

La EA es un desorden neurodegenerativo, progresivo e irreversible del sistema nervioso central que se caracteriza, por una pérdida gradual de la memoria, del lenguaje, del razonamiento y de las funciones motoras, también lo pacientes que padecen esta enfermedad presentan falta de juicio, agitación, y alucinaciones lo que lleva a que éste sea incapaz de relacionarse con los demás e incluso reconocerse a sí mismo, la pérdida de estas habilidades no debe de ser considerada como parte del envejecimiento normal, dado que el deterioro cognoscitivo que se presenta de una manera mucho menor y más lento. [16]

La progresión de los síntomas que presenta un individuo afectado por la EA puede dividirse en tres etapas: En la primera etapa las neuronas y el hipocampo se ven afectados lo que conduce a una pérdida de la memoria a corto plazo. En la segunda etapa de la enfermedad se ven afectadas las regiones corticales del cerebro, lo que conduce a pérdida esporádica de la memoria a largo plazo, así con una disminución de las habilidades cognoscitivas, se presenta confusión y cambios en la personalidad. Posteriormente en la última etapa, varias regiones del cerebro se ven afectadas lo que lleva a la pérdida del control de muchas de las funciones fisiológicas normales lo que lleva a que estas personas sean totalmente dependientes de las personas a su alrededor. Por último los pacientes fallecen por complicaciones, que incluyen una neumonía, infecciones del tracto urinario o un golpe físico [16,17, 18, 19].

3.2.4 Características Neuropatológicas.

Los conocimientos neuropatológicos que se tienen sobre la EA, señalan que esta enfermedad, se puede distinguir de otras en base a dos lesiones características, que se pueden encontrar en los cerebros de estos pacientes. Una de estas inclusiones son las placas amiloides o también llamadas placas seniles, constituidas principalmente de agregados del péptido β amiloide ($A\beta_{42}$), el cual se forma a través del corte enzimático de la proteína precursora del β -amiloide (PPA). La otra inclusión que se puede encontrar con las marañas de neurofibrillas (NFT's) [19, 20], las cuales se encuentran compuestas por la forma anormal de la proteína tau que se encuentra hiperfosforilada. Las características antes mencionadas, no son las únicas que se pueden encontrar en los cerebros de los pacientes, también se pueden encontrar células derivadas de un proceso inflamatorio como neuritis distróficas. [20, 21, 22, 23, 24, 25]

Para entender el desarrollo de la enfermedad, es importante conocer con más detalle estas características histopatológicas, por lo que a continuación se describen:

- **Placas amiloides:** Son depósitos extracelulares constituidos de $A\beta$ que se encuentran en la corteza cerebral del paciente con EA. Estas placas comúnmente son clasificadas de acuerdo a su estado de agregación en placas difusas o densas. Las placas difusas están formadas por una pequeña cantidad del péptido $A\beta$, usualmente este tipo de placas no se encuentran asociadas a una pérdida sináptica, por lo que no se consideran patológicas. Por último las denominadas placas densas están formadas por fibrillas altamente estables del péptido $A\beta$. Estas se encuentran asociadas con una pérdida de la actividad sináptica, por lo que son consideradas patológicas.[20, 21, 22, 23, 24, 25]

- **Marañas de neurofibrillas:** Son agregados proteicos intraneuronales, formados a partir de la forma hiperfosforilada de la proteína asociada a microtúbulos, esta proteína recibe el nombre de TAU. Este tipo de marañas conduce a la muerte de las neuronas, y se ha encontrado que la progresión espacio temporal de estas, se encuentra ligada de manera directa a la severidad del decaimiento cognoscitivo.[20, 21, 22, 23, 24, 25]
- **Neuritis distróficas:** Se llaman así a aquellas dendritas y axones, que se inflaman de manera anormal debido al estrés neuronal que se da en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas. [20, 21]

3.2.5 Etiología y factores de riesgo.

Las causas que llevan al desarrollo de la EA aún no se conocen. Un pequeño porcentaje de los casos (5-10%) puede ser explicado a través de mutaciones genéticas teniendo una edad de inicio temprano, mientras que la mayor parte (90-95%) se consideran esporádicos teniendo una edad de inicio tardío. Esta enfermedad crónica al igual que otras, es considerada una enfermedad multifactorial, es decir que se desarrolla como resultado de diversos factores [24].

Edad: es el más importante factor de riesgo en el desarrollo de la EA, cerca del 1% de los individuos se ve afectado a la edad de los 65 años, este número se puede duplicarse en personas con 95 años o más, llevando a que el número de la población afectada se duplique para el año 2030 [26, 27, 30].

Historia Familiar: Las personas que poseen un familiar de primer grado con EA, tienen un 20% más de riesgo de padecer la enfermedad. Cuando la persona posee más de un familiar afectado el riesgo de padecer la enfermedad se ve significativamente incrementado hasta un 50% de susceptibilidad [27, 28, 29, 30].

Género: Este es un factor de riesgo importante dentro de la población adulta mayor, ya que se ha demostrado que la incidencia de la EA en la mujer es mayor que la del hombre, después de los 85 años [26, 27, 28].

Trisomía 21: Se ha encontrado que en los individuos, que se ven afectados por este síndrome, tienen el doble de riesgo de padecer EA. Se ha observado que los individuos expresan los caracteres clínicos y patológicos, alrededor de los 40 años de edad [31].

Tratamiento con fármacos anti-inflamatorios: Los pacientes que llevan un largo tiempo, con un tratamiento de antiinflamatorios tanto esteroideos como no esteroideos, demuestran una disminución en el riesgo de padecer la EA. Esto sugiere que la inflamación puede jugar un papel importante, en la etiología de la enfermedad [27, 29].

Traumatismo craneal: Se ha demostrado que los sujetos que han sufrido algún trauma craneal son más susceptibles al padecimiento de la EA. El mecanismo que lleva, al desarrollo de la enfermedad es mediante, el metabolismo anormal de la proteína TAU, los depósitos de A β que se llegan a observar, se dan de manera incidental como un fenómeno relacionado a la edad [31,33, 32]

Nivel educativo: Se tiene la idea de que el nivel educativo se puede asociar a la EA, esto se debe a que se tiene la hipótesis de que el nivel educativo alto disminuiría el riesgo de padecer la enfermedad, debido a que los cerebros de dichas personas, al ejercitar mucho la mente, tienen una mayor reserva funcional. Muchos de los estudios que se han realizado difieren, respecto a la asociación que se pueda tener entre el nivel cultural y la incidencia de la EA [26, 27, 28].

Tabaquismo: A pesar de los estudios que se han hecho, la relación que existe entre el hábito de fumar y el decaimiento cognoscitivo, aún permanece incierta.

Por un lado se ha encontrado que el fumar puede disminuir el riesgo de padecer la EA, debido a que se tiene la hipótesis, de que la nicotina incrementa el nivel de los receptores nicotínicos de acetil-colina, contrabalanceando la pérdida de estos receptores y subsecuentemente deficiencias colinérgicas, observadas en la EA.

Por el otro lado también se observa que el fumar puede incrementar la generación de radicales libres, lo que lleva a un aumento en el nivel de estrés oxidativo,

activando a los fagocitos, lo que conduce a un mayor daño oxidativo, por lo tanto a que se incremente el riesgo de padecer la EA.

A pesar de todo esto, se requiere de un mayor número de estudios, para poder confirmar cualquiera de las dos posibilidades [28, 29].

3.2.5.1 Factores de riesgo genéticos.

El factor de riesgo genético mejor establecido en la EA de inicio tardío tanto esporádico como familiar, es el gen de la *Apolipoproteína E (APOE)*, cuyo alelo $\epsilon 4$ se encuentra asociado a una mayor susceptibilidad de padecer la EA de inicio tardío, ya que este polimorfismo modifica la edad de inicio por un efecto de dosis ya que a mayor número de copias del alelo $\epsilon 4$, la edad de inicio disminuye [33, 34, 35].

3.2.5.2 Apolipoproteína E.

El gen *APOE* se encuentra en la región cromosómica 19q13.32 conformado por 4 exones, codifica para una glicoproteína de 299 aminoácidos, la cual se expresa principalmente en el hígado y el cerebro (especialmente en neuronas y astrocitos). Su función principal es la redistribución y movilización del colesterol en la periferia, también se encuentra involucrado tanto en la reparación como en el crecimiento neuronal; en la regeneración del tejido nervioso, la inmunoregulación y en la activación de diversas enzimas lipolíticas [34, 36]

El gen *APOE* se puede encontrar en 3 alelos diferentes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ que al combinarse dan origen a 6 genotipos. Se ha encontrado que las personas que poseen un alelo $\epsilon 4$, desarrollan la EA a una edad más temprana mientras que las personas que poseen el alelo $\epsilon 2$, tienden a desarrollara la enfermedad a una edad más tardía [37]. El alelo $\epsilon 2$ en población caucásica tiene una frecuencias del 6%, $\epsilon 3$ presenta una frecuencia del 78% mientras que $\epsilon 4$, tiene una presencia del 16%. La relación entre la *APOE* y la EA se establece mediante la expresión del alelo $\epsilon 4$, ya que aquellos individuos que poseen una sola copia de este alelo,

tienen un riesgo del 1.1-5.6 veces mayor de padecer la EA, mientras que el riesgo de un homocigoto para este alelo es de 2.2-33.1 veces más [37, 38, 39]

El mecanismo por el cual el alelo $\epsilon 4$ se encuentra asociado a un inicio más temprano de la enfermedad aún no es claro, pero se tiene la hipótesis de que el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* funciona como mediador en la agregación del $A\beta$ y también en la hiperfosforilación de la proteína tau [39].

3.2.6 Patogenia.

Las dos principales proteínas involucradas en el desarrollo de la EA, son el $A\beta$ componente principal de las placas seniles y la proteína tau, que se encuentra en los ovillos o marañas neurofibrilares. Las investigaciones diagnósticas, clínicas y patológicas, señalan que el $A\beta$ tiene un papel importante en el desarrollo de la EA, llevando a que se establezcan diferentes hipótesis, como la de la *cascada amiloide*, que cuenta con el mayor apoyo científico [11, 21, 39, 40, 41, 42, 43,44].

3.2.6.1 Producción del Péptido β -amiloide.

El péptido β -amiloide es un péptido de 36 a 43 aminoácidos (a.a), producto de la proteólisis de una proteína precursora llamada, Proteína Precursora del β -amiloide (PPA) [45]. La PPA es una proteína integral de membrana tipo-1 formada por 770 a.a, la cual se expresa en diferentes tejidos incluyendo las neuronas. Su principal función aún no es conocida, pese al tiempo que se ha estudiado, aunque ha sido implicada en la plasticidad neuronal y como un regulador de la sinapsis. Esta proteína se sintetiza en el retículo endoplasmático, llega al aparato de Golgi donde sufre modificaciones post-transcripcionales, por último es transportada a la superficie celular a través de vesículas transportadoras, también puede ser endocitada desde la superficie celular y procesada a través del sistema endosomal-lisosomal. Cuando la PPA se encuentra en la membrana celular, es procesada de manera proteolítica por medio de 2 vías metabólicas competitivas, la no amiloidogénica y la amiloidogénica, estas vías se encuentran reguladas por

diferentes factores, como el estado hormonal y las mutaciones genéticas, las cuales determinan la producción del A β [45, 46, 47].

- Vía no amiloidogénica: En esta vía que es la más común, la PPA es cortada entre los a.a 687 y 688 correspondientes a los residuos 16 y 17 del A β por una proteasa, conocida con el nombre de α -secretasa, lo que produce un fragmento alfa soluble no amiloidogénico ($sPPA_{\alpha}$), que es liberado al espacio extracelular, dejando un fragmento carboxilo terminal de 10 KD unido a la membrana conocido como C83. El fragmento C83 es escindido entre los a.a 712, 714 o 715 [10] correspondientes a los residuos 40, 42 o 43 del A β por una secretasa, conocida como γ -secretasa, lo que da como resultado un péptido no dañino de 3 KD, que es liberado al espacio extracelular, es soluble y no se acumula, este es conocido como p3 (Fig. 1) [10, 21, 45, 47, 48, 49, 50, 51]
- Vía amiloidogénica: En esta vía que es la menos común, el proceso es iniciado por un complejo neuronal conocido como β -secretasa y a este complejo se denomina como BACE-1 (Enzima de anclaje al sitio β de la PPA), que escinde a la PPA en los residuos 671 y 672, liberando al espacio extracelular un fragmento beta soluble ($sPPA_{\beta}$), dejando anclado a la membrana un fragmento carboxilo terminal de 12KD conocido como C99. Posteriormente una proteasa llamada γ -secretasa, escinde al fragmento C99 por los residuos 712, 714 o 715 [10], que da como resultado la formación del A β . El A β está compuesto de 39 a 43 a.a, en condiciones normales la forma que más abunda, es la que está compuesta por 40 a.a (A β 40) la menos tóxica, mientras que la que está en menor proporción debido a su mayor toxicidad es la forma compuesta por 42 a.a (A β 42). A β 42 es insoluble y es la más propensa a oligomerizarse, lo que causa que se acumule y se autoagregue para posteriormente formar las fibrillas insolubles que se encuentran en el centro de las placas seniles, llevando a la disfunción o pérdida neuronal (Fig. 1) [10, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51].

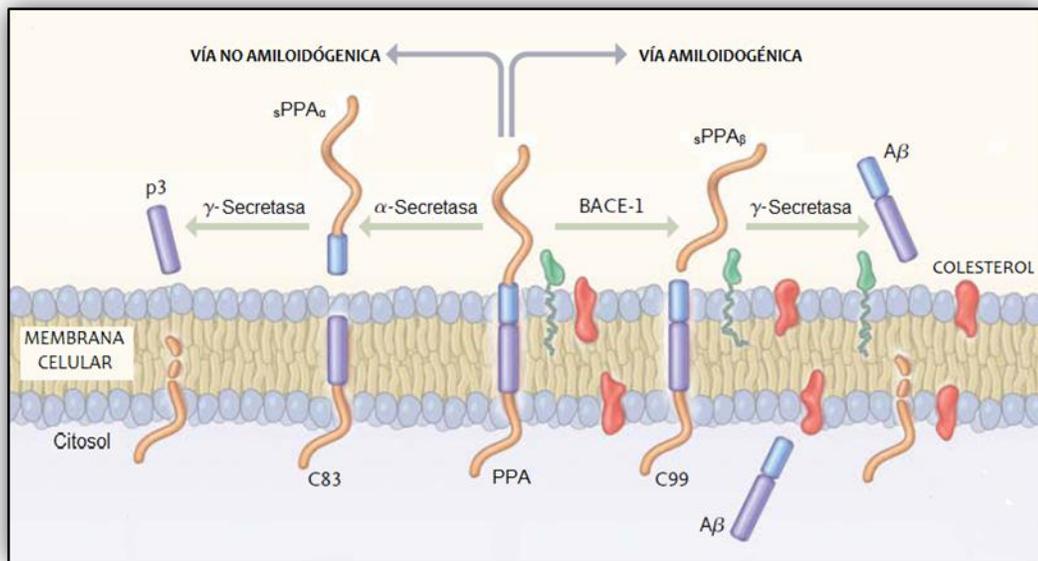


Figura 1. Procesamiento a través de las dos vías metabólicas de la PPA. Tomada y modificada de Querfurth H. W., LaFerla F. M. [45]

3.2.6.2 Cascada amiloide.

La hipótesis de la cascada amiloide, propone que el desbalance entre la producción y eliminación del A β , produce que los monómeros del A β se asocien formando un oligómero neurotóxico, que se asocia en fibrillas insolubles, depositándose en forma de placas seniles. En los casos de EA familiar el desbalance ocurre debido a mutaciones patogénicas, en los diferentes genes involucrados (*PPA*, *PSEN1*, *PSEN2*), mientras que en los casos de EA esporádicos, varios factores se ven involucrados, como los antes mencionados (Fig. 2) [37, 39, 52, 53].

La manera en la que las placas seniles dañan a las neuronas, se debe a que estas inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y ácido nítrico (AN). La producción de estas especies tóxicas están ligadas a la disminución de la glutatión peroxidasa (GSH), a la acumulación de peroxinitrito dentro de la mitocondria, y la peroxidación de la membrana lipídica. Se cree que la sobreproducción del A β induce la hiperfosforilación de la proteína tau, llevando a

la formación de marañas neurofibrilares, contribuyendo sustancialmente al proceso de la enfermedad [54, 55, 56, 57, 58]

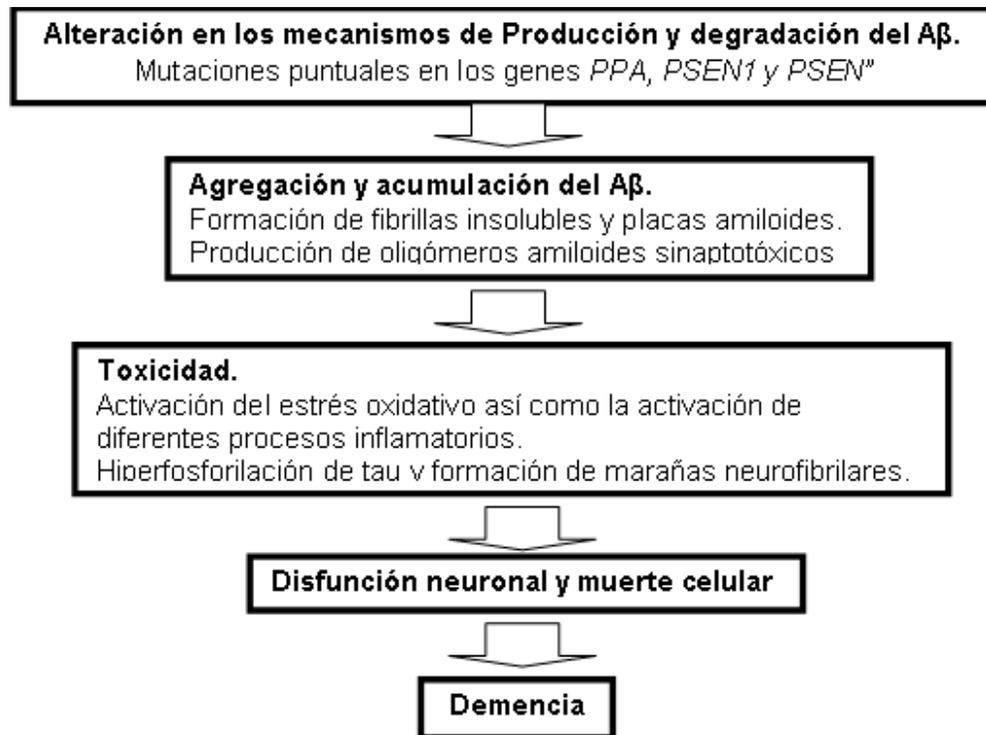


Figura 2. Hipótesis de la cascada amiloide que explica el mecanismo por el cual se lleva al desarrollo de la demencia. Tomada y modificada de Gallagher D. J, *et al.* [53].

Algunas de los hechos que sustentan a esta hipótesis son:

- Se encontró que mutaciones en los genes *PSEN1* y *PSEN2*, afectan el metabolismo de la PPA, a través de un efecto directo en la γ -secretasa [59].
- Se demostró que mutaciones en el gen que codifica a la proteína tau, causan una enfermedad neurodegenerativa, conocida como Demencia Frontotemporal con parkinsonismo [58, 59].

Esto quiere decir, que a pesar de los muchos depósitos de la proteína tau en forma de marañas neurofibrilares en el cerebro, no son suficientes para inducir la producción de placas seniles o amiloides, características de la EA.

- Ratones transgénicos que sobreexpresan una PPA y proteína tau mutante, llevan a una incrementada formación de marañas tau positivas, estos ratones se compararon con ratones que sobreexpresaban solamente la proteína tau, encontrando que la estructura y el número de placas seniles permanecieron iguales [57, 59].

Esto indica, que el proceso alterado de la PPA ocurre antes, que se presenten alteraciones dentro de la proteína tau, dentro de la cascada patogénica de la EA [56, 57, 59].

A pesar de todos estos hechos, la hipótesis no explica el origen de la enfermedad, esto no solo se debe a la falta de estudios, sino también a que es una enfermedad multifactorial, por lo que no solo va a existir una vía en el desarrollo de esta enfermedad [59].

3.2.6.3 Mecanismo de la proteína tau en la EA.

La proteína tau es relativamente abundante en las neuronas, pero se presenta en todas las células nucleadas. La función fisiológica que desempeña es la de unirse a los microtúbulos, y de esta manera estabilizar el ensamblaje de estos mediante la polimerización de la tubulina en la célula. Los microtúbulos son estructuras que además de estabilizar a la célula sirven de medio de transporte para los nutrientes y moléculas esenciales (Fig. 3) [37, 44, 45]

El componente mayoritario en las marañas de neurofibrillas, es la forma hiperfosforilada de la proteína tau, la cual es insoluble, además de que carece de afinidad por los microtúbulos, y se asocia a si misma en estructuras denominadas filamentos helicoidalmente pareadas, por lo que los microtúbulos se desorganizan conduciendo a la muerte del axón [45, 61, 62]

Se encontró que el número de marañas de neurofibrillas, se pueden usar como un marcador patológico, para determinar la severidad de la EA [45, 62].

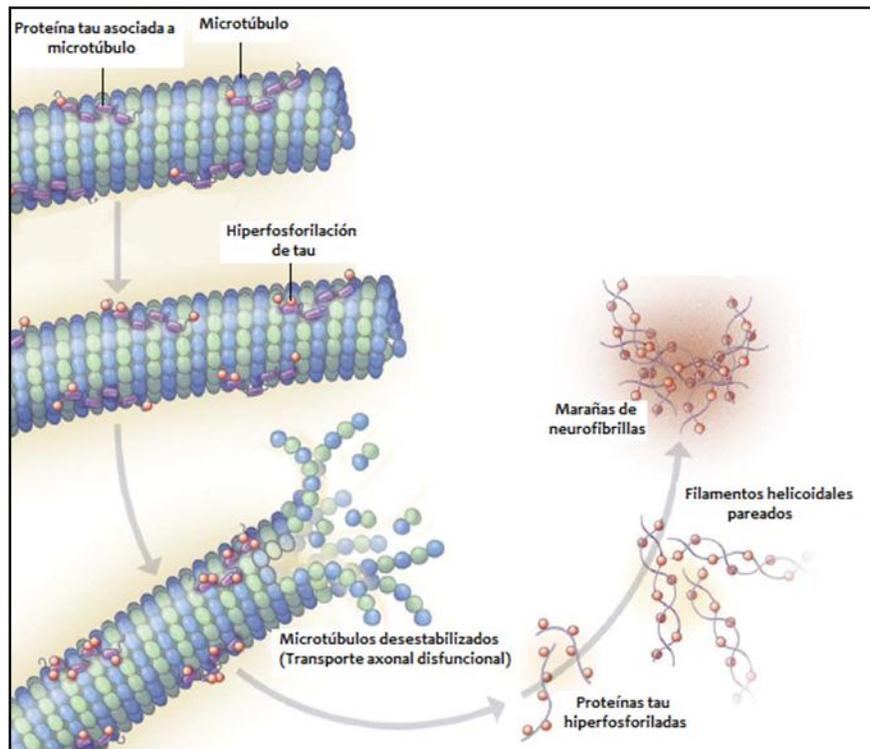


Figura 3. Formación de las marañas de neurofibrillas. Tomada y modificada de Querfurth H. W., LaFerla F. M. [45]

3.2.7 Genética de la EA.

La EA se puede presentar, tanto en forma familiar como esporádica, lo que la convierte en una enfermedad heterogénea.

La forma esporádica de inicio tardío (>65 años) de la enfermedad, representa cerca del 75% de todos los casos, mientras que una pequeña cantidad de los casos son de inicio temprano (<65 años) y los cuales siguen un patrón de herencia autosómico dominante, estos representan menos del 5% de todos los casos [63,64]. El estudio genético a las familias afectadas por la EA familiar de inicio temprano ha dado lugar a la identificación de 3 genes causales de esta enfermedad:

- El gen que codifica para la *Proteína Precursora del β -Amiloide (APP)* que se encuentra localizado en el cromosoma 21, conformado por 18 exones, en este gen se han identificado 61 mutaciones [57, 63, 64, 65].

- El gen de la *Presenilina-1 (PSEN1)* se localiza en el cromosoma 14, está conformado por 12 exones. En este gen se han descrito 218 mutaciones, que explican más del 50% de los casos de EA de inicio temprano [57, 63, 64, 65].
- El gen de la *Presenilina-2 (PSEN2)* localizado en el cromosoma 1, conformado por 12 exones, cuyas mutaciones son menos frecuentes, y en él se han descrito 24 mutaciones [57, 63,64, 65].

En la siguiente tabla se muestran los 3 principales genes implicados en la EA de inicio temprano, así como la penetrancia de estos y su función en el desarrollo de la EA.

Tabla 3. Genes involucrados en el desarrollo de la EA de inicio temprano de tipo familiar. Tomada y modificada de Bekris L. et al. Y Gallagher D. J, et al. [16, 53].

Gen	Proteína	Localización	Penetrancia	Papel que juegan las mutaciones en el desarrollo de la EA.
APP	Proteína Precursora del β amiloide	21q21.22	Completa	Promueven que el corte de la PPA se realice en los sitios β o α , aumentando la producción de $A\beta$
PSEN1	Presenilina 1	14q24.3	Completa	Promueven que el corte de la PPA se realice el sitio γ , aumentando la producción de $A\beta$
PSEN2	Presenilina 2	1q31-q42	~95%	Promueven que el corte de la PPA se realice el sitio γ , aumentando la producción de $A\beta$

a) Proteína Precursora Amiloide.

Este gen fue identificado en el año de 1987 por diferentes laboratorios, convirtiéndose en el primer gen en ser asociado al desarrollo de la EA. Se encuentra localizado en la región cromosómica 21q21.22, conformado por 18

exones y codifica una proteína de 964 aminoácidos. El descubrimiento de este gen, surgió a partir de estudiar personas afectadas por Síndrome de Down (trisomía 21) [31], ya que se observó, que las personas afectadas por este síndrome que fallecían después de los 40 años, presentaban en la autopsia, una histopatología parecida a la EA; formada por placas seniles y marañas de neurofibrillas, lo que permitió asociar a las mutaciones en el gen *APP* con el desarrollo de la enfermedad [66, 67, 68, 69].

La primera mutación descrita es el cambio de una valina por una isoleucina en la posición 717, que se localiza en el dominio transmembranal, cerca del sitio de corte de γ -secretasa [70, 71].

Muchas de las mutaciones en este gen alteran el proceso de la PPA, de tal manera que aumentan el nivel de $A\beta_{42}$, conduciendo al desarrollo de la EA [66, 67].

b) Presenilina-1.

Muchos de los casos de EA familiar con herencia de tipo autosómico dominante, están causados por mutaciones en este gen (~50%), el cual se encuentra localizado en la región cromosómica 14q24.3, conformado por 12 exones y codifica una proteína de 467 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 50kD. Hasta el momento se han descrito cerca de 218 mutaciones en este gen, muchas de estas mutaciones son mutaciones sin sentido, lo que da como resultado un simple cambio de aminoácido, en menor frecuencia se encuentran mutaciones más complejas, como las pequeñas deleciones [49, 57, 66].

Todas las mutaciones patogénicas en este gen, causan una ganancia de toxicidad, la cual está determinada por un incremento en la relación $A\beta_{42}$ y $A\beta_{40}$, esto nos indica que las mutaciones pueden modificar la manera en la que γ -secretasa escinde a la PPA [68, 72, 73, 74]. En la tabla 4 se muestra el número mutaciones puntuales en cada uno de los exones así como el número de familias donde se ha identificado cada una de acuerdo a la base de datos *Molgen* [75].

Tabla 4. Mutaciones puntuales en el gen *PSEN1*. Tomada y modificada de <http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/>. [75]

Exón	No. de mutaciones	No. de familias
4	15	31
5	48	93
6	25	43
7	52	75
8	41	81
9	1	1
10	2	2
11	17	27
12	17	52

c) Presenilina 2.

Este gen fue identificado en el año de 1995 por Levy-Lahad y colaboradores, como resultado de un estudio de linaje en una población Volga con ancestros alemanes. Este gen presenta homología con *PSEN1*, se encuentra localizado en la región cromosómica 1q31-q42, conformado por 12 exones y codifica una proteína de 448 aminoácidos [67, 68, 70].

Este gen es un componente de la γ -secretasa, se expresa en diferentes tejidos, incluyendo el cerebro, donde principalmente se expresa en las neuronas. Las mutaciones en este gen son muy poco frecuentes (24 mutaciones), en comparación con los otros dos genes [67, 68, 70].

Las mutaciones en este gen, al igual que en la *PSEN1*, causan que haya una ganancia de toxicidad que se da, como resultado de un incremento en la producción de A β 42, indicando que estas mutaciones pueden modificar la manera en la que es procesado el PPA a través de la γ -secretasa [67, 68, 70].

3.2.8 Presenilina 1.

3.2.8.1 Estructura y localización del gen.

Años después del descubrimiento de mutaciones en el gen de la PPA, fue descubierto un nuevo locus en el cromosoma 14, este descubrimiento se produjo por el año de 1992 por Schellenberg y George-Hyslop [49, 76], mediante estudios de linaje, tres años después las técnicas de clonaje posicional condujeron a la identificación de mutaciones en este gen. [76].

Este gen se encuentra localizado en la región cromosómica 14q24.3 [57] (Fig. 4), conformado de 12 exones, de los cuales, los primeros dos, son regiones no traducibles, lo que da como resultado que la proteína este codificada solamente del exón 3 al 12, y resulta en un producto de 467 a.a. [63, 66, 76].

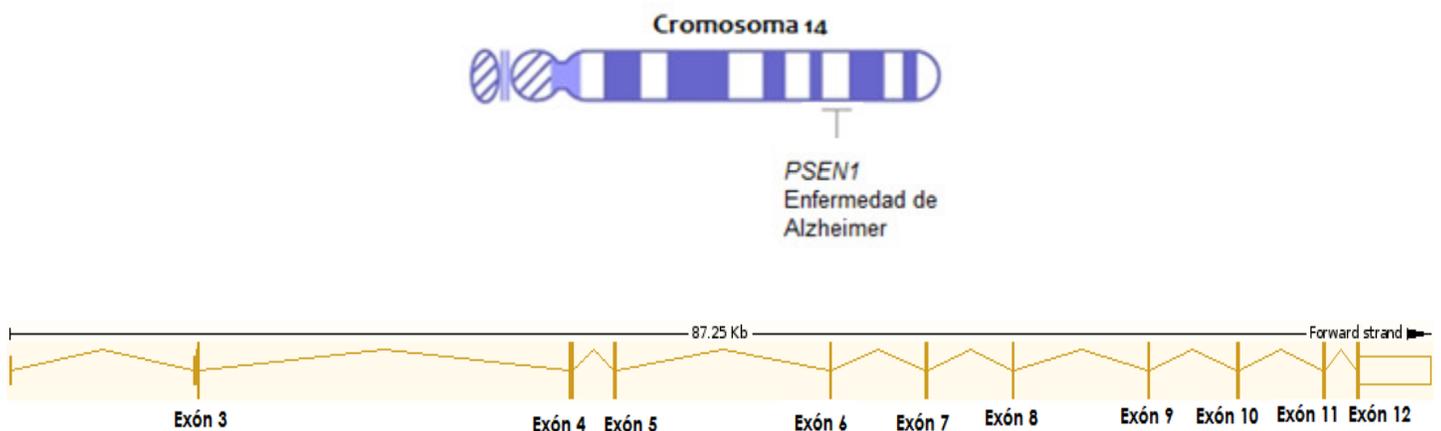


Figura 4. En la parte superior se muestra la localización del gen *PSEN1* en la región cromosómica 14q24.3. En la parte inferior se muestra una imagen modular del gen *PSEN1*, donde se observan del exón 12 al 3 de izquierda a derecha. Tomada y modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22266/> y <http://www.ensembl.org> [77 y 78].

3.2.8.2. Topología y estructura de la proteína PSEN1.

La proteína PSEN1 se encuentra principalmente localizada en membranas intracelulares u organelos, como el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi [80].

Los análisis de hidrofobicidad, han demostrado que esta proteína presenta diez regiones hidrofóbicas, de por lo menos 15 a.a. de longitud, las cuales potencialmente pueden atravesar la membrana. Estudios en la topología de la proteína, han demostrado que el extremo amino terminal se encuentra orientado hacia el citoplasma, mientras que el asa que conecta al segmento I con el II se encuentra orientado hacia el lumen, lo que confirma que los 6 primeros dominios atraviesan la membrana celular, a diferencia del dominio HR 7 que solo se encuentra asociado a la membrana (Fig. 5) [80, 81, 82].

Existen diferentes modelos sobre los últimos 3 dominios hidrofóbicos, donde en algunos de estos se muestra que la proteína solo presenta 8 dominios transmembranales lo que lleva a que el carbono terminal se oriente hacia el citosol, mientras que en este esquema se presenta el modelo más nuevo en donde existen 9 dominios transmembranales, lo que conduce a que el carboxilo terminal se encuentre orientado hacia el lumen [80, 81, 82].

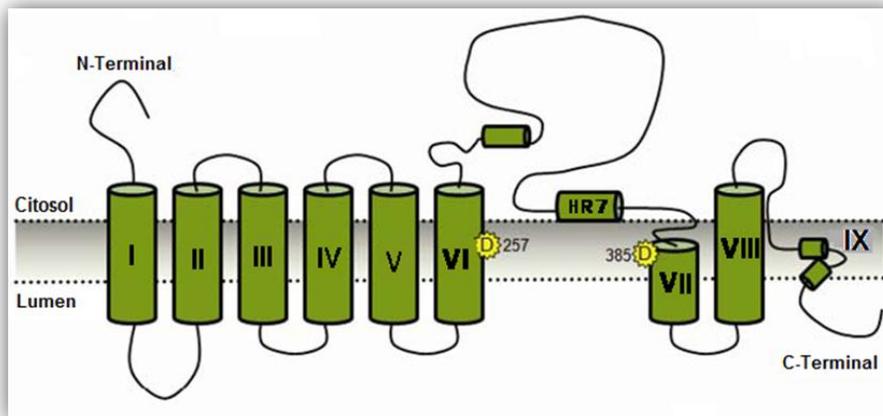


Figura 5. Estructura de la proteína Presenilina 1. Tomada y modificada de Supnet C. y Bezprozvanny I. [80]

3.2.8.3 Conservación entre especies.

La proteína PSEN-1 se encuentra conservada entre diferentes organismos. Esta proteína muestra homología con una gran variedad de especies: en Protistas (*Dictyostelium discoideum*), plantas (*Arabidopsis thaliana*), invertebrados (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Helix lucorum*) y vertebrados (*Rana temporaria*, *Mus musculus*), pero no se encuentra en bacterias ni hongos [83, 84].

PSEN1 presenta una similitud del 57% con *Drosophila melanogaster*, y comparte un 60% de homología con la proteína Sel-12 la cual está presente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* [54, 84].

Con toda esta información se encuentra que el grado más alto de homología entre la proteína PSEN1 humana y otras especies, reside en los aminoácidos que rodean a los dos residuos de ácido aspártico, localizados en los dominios transmembranales VI y VII, los cuales presentan regiones críticas en la función de la proteína [83, 84, 85].

3.2.8.4. Localización y expresión.

Esta proteína se encuentra ampliamente distribuida tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos (principalmente en el sistema nervioso central). A nivel subcelular se encuentra localizada en la membrana intracelular del retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi [79, 81].

La principal función de la proteína PSEN1 es la de formar parte del núcleo catalítico del complejo γ -secretasa el cual se encuentra involucrado en el procesamiento de la PPA, también se le han asociado otras funciones como: homeostasis del calcio, regulación de las señales de β -catenina y en la vía de señalización Notch [79, 81, 82]

Esta proteína se expresa altamente en regiones cerebrales afectadas por la EA como el hipocampo, la corteza cerebral, y la amígdala, en las cuales se encuentra

una gran concentración de placas seniles, y marañas de neurofibrillas, aunque su expresión no se encuentra restringida solo a estas zonas afectadas, sino que también se puede encontrar en neuronas localizadas en áreas del cerebro no afectadas por la EA [79, 81, 82].

3.2.8.5 Degradación y Procesamiento.

La Proteína PSEN1, es sintetizada en un polipéptido de 467 aminoácidos el cual sufre un proceso endoproteolítico altamente regulado, el cual ocasiona que la secuencias sufra divisiones proteolíticas. La proteína completa (467 a.a) tiene una vida media corta de 1 a 2 horas, la cual es procesada a través de la presenilinas, ésta actúa sobre el asa citoplasmática, que conecta los dominios transmembranales VI y VII, dando como resultado 2 fragmentos estables, uno de 27 a 28 KD conteniendo al amino terminal y el otro de 16 a 17KD el cual contiene al extremo carboxilo terminal, cabe mencionar que este proceso se encuentra muy conservado y quizás sea el proceso más crítico en la estabilidad y posible actividad biológica de la proteína. La vida media de los fragmentos obtenidos es mucho mayor (24 horas) que la proteína completa, lo que indica que estos fragmentos son incorporados y estabilizan al complejo γ -secretasa, convirtiéndose en la parte funcional de la proteína, mientras tanto ésta al ser inestable es degradada por el proteosoma [54, 81, 82].

La división de la proteína ocurre en el aminoácido 298, el cual se encuentra codificado por el exón 9, y se ha demostrado que el proceso endoproteolítico no ocurre en variantes de la proteína que carecen del exón 9 [81].

PSEN1 también puede ser procesada por varios miembros de la súper familia de las caspasas, el cual ocasionan la división de la proteína en los residuos Asp329/Ser330 y Asp329/Ser330 y afectando la regulación de la apoptosis. Al fragmento de la proteína PSEN1 que contienen al carboxilo terminal se le atribuyen un efecto anti-apoptótico [82, 86].

3.2.8.6 Funciones biológicas.

a) Vía de señalización Notch.

La proteína PSEN1 juega un papel importante en el procesamiento del receptor Notch, el cual se encuentra regulando la diferenciación celular, durante el desarrollo de los organismos multicelulares. [87, 88]

Los estudios que llevaron a la asociación de la proteína PSEN1 y la vía de señalización Notch fueron realizados empleando el gen homólogo *sel-12*, el cual se encuentra en el nemátodo *C. elegans*. La proteína Sel-12 que es codificada por el gen que recibe el mismo nombre, es capaz de facilitar la señalización del receptor transmembranal lin-12 (Homólogo de Notch), lo que demostró que la proteína PSEN1 se encuentra involucrada en la vía de señalización Notch [54, 88, 89].

Notch es una proteína transmembranal tipo I, la cual juega un papel importante en la embriogénesis de organismo multicelulares, en el desarrollo neuronal, en la neurogénesis, en el crecimiento neurítico, en el mantenimiento de la células madre, en la plasticidad sináptica y en la memoria a largo plazo [79, 87, 88].

Notch es procesado proteolíticamente por la proteasa furina, lo que da como resultado un receptor heterodimérico que se encuentra anclado a la superficie celular, posteriormente se da una interacción con ligandos afines. La activación de Notch es inducida a través de una familia de ligandos transmembranales (DLS), los cuales se encuentran en células adyacentes, esto lleva a que Notch sea susceptible a otra proteólisis cerca del domino extracelular/transmembranal, la cual va a ser efectuada por desintegrinas y metaloproteinasas (ADAM10/ADAM17). Después el remanente que se encuentra en la membrana es cortado por el complejo γ secretasa, lo que lleva a que se libere el dominio intracelular de Notch (NICD), el cual es trasladado al núcleo donde funciona como un factor de transcripción en genes relacionado con el destino de la célula (Fig. 7) [88, 89].

La analogía entre el procesamiento de Notch y la PPA, es que ambas proteínas son sustratos del complejo γ -secretasa. Se ha asociado a la proteína Notch con procesos de aprendizaje y de memoria, lo que lleve a la implicación de un asociación potencial entre la señalización Notch y la EA [54, 79, 83, 88].

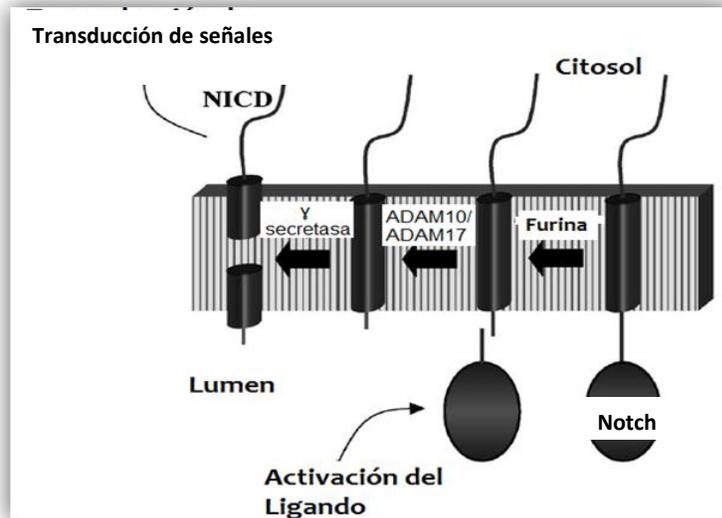


Figura 6. Se muestra el procesamiento de la proteína Notch hasta conducir a la transducción de señales. Tomada y modificada de Wolfe M. S. [88]

b) Vía β -catenina.

Hay información contundente sobre la conexión que existe entre la proteína PSEN1 y la señalización implicada en la degeneración neuronal, la cual se da mediante la unión de la proteína PSEN1 y diferentes miembros proteínicos de la familia de las cateninas. La β -catenina forma parte de una familia de proteínas relacionadas al armadillo [54, 79].

Una de las dos funciones en las que se encuentra implicada la proteína β -catenina, es la adhesión celular en células de adhesión tipo caderina, por último participa en la cascada de señalización Wingless/Wnt, en invertebrados y vertebrados respectivamente la cual interviene en el desarrollo de la proliferación celular [90, 91, 92].

Los niveles citoplasmáticos de β -catenina se encuentran regulados, por GSK-3 β y APC. GSK-3 β al ser activada fosforila a β -catenina, lo que produce que sea ubiquitinada y por último degradada vía proteosoma [91, 92].

Al ser activada la vía Wnt, la actividad de GSK-3 β es inhibida, lo que conduce a la estabilización de β -catenina y por lo tanto a que esta se acumule en el citoplasma, donde se une al factor de transcripción Celular (TCF), posteriormente este complejo (TCF/ β -catenina) es trasladado al núcleo donde la transcripción de genes se inicia [90, 91, 92].

Algunos estudios señalan que la proteína PSEN1, contribuye a la fosforilación de β -catenina, en una vía diferente a la Wnt, lo que produce que β -catenina no se acumule, ya que diferentes estudios han demostrado que en ausencia de PSEN1, β -catenina se acumula y ocasiona, graves daños [90, 91, 92].

Se ha encontrado que GSK-3 β no solo se encuentra involucrada en la regulación intracelular de las β -cateninas, sino que también se puede involucrar en la hiperfosforilación de la proteína tau, durante la formación de las marañas neurofibrilares. Esta hipótesis fue propuesta gracias a que se encontró que PSEN1 se puede unir directamente a la proteína tau y a GSK-3 β , y que esta unión se incrementa con las mutaciones en PSEN1, lo que contribuye a la hiperfosforilación de la proteína tau, y como consecuencia a la formación de las marañas de neurofibrillas [82, 90, 91, 92].

c) Presenilina 1 en el complejo γ -secretasa.

La evidencia de que la proteína PSEN1, forma el sitio catalítico del complejo proteolítico γ -secretasa viene de varios estudios, donde se muestra que diferentes inhibidores de γ -secretasa también se unían a PSEN1. En estos estudios también se demostró que estas moléculas inhibitoras de γ -secretasa, se unían de manera específica a los 2 fragmentos (amino terminal y carbonilo terminal) de la proteína PSEN1, mientras que en la proteína completa no se presentaba esta unión, lo que sugería que la forma completa de la proteína era el precursor inactivo de la forma dimérica de la Presenilina [54, 93, 94, 95].

También se demostró la actividad catalítica de PSEN1 en el complejo γ -secretasa, mediante la identificación de 2 importantes residuos de aspartato en las posiciones 257 y 385, los cuales al sufrir mutaciones el efecto de γ -secretasa era reducido, lo que también sugirió que Presenilina era una proteasa de aspartilo [94, 95, 96, 97].

Ya que la sola expresión de la proteína PSEN1, no aumenta la actividad del complejo γ -secretasa, además de que PSEN1 necesita de diferentes factores celulares que lleven a que esta proteína madure y forme complejos de alto peso molecular, lo que sugirió que el complejo γ -secretasa estaba compuesto por más que solo Presenilina. Esto llevó a la identificación de otros componentes de este complejo, el primer en ser descubierto fue nicastrina. La Nicastrina es una proteína transmembranal tipo I (120-140 KD), la cual es requerida para la estabilización de las subunidades de PSEN1. Sin embargo la sobreexpresión de PSEN1 y nicastrina, no conducía a un incremento en la actividad de γ -secretasa, por lo que se concluyó que había componentes que hacían falta descubrir. La búsqueda de nuevos modificadores para Notch en *C. elegans*, llevó a la identificación de dos nuevos genes, *Aph-1* que codifica una proteína de 30 KD y *Pen-2* que codifica para una proteína de 12 KD. Todo esto llevó a la conclusión de que estos cuatro componentes forman parte del complejo γ -secretasa (Fig. 8) [97, 98, 99].

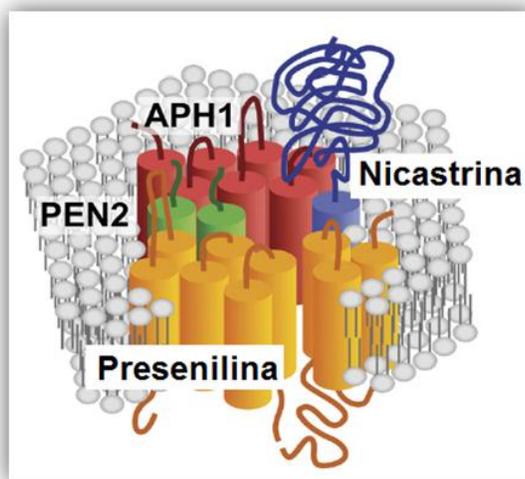


Figura 7. Complejo γ -secretasa. Tomada y modificada de Parks A. L. y Curtis D. [93]

La formación del complejo catalítico de γ -secretasa se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. La forma inmadura de las proteínas Nicastrina y Aph-1 forma un subcomplejo en el retículo endoplasmático, que se une y estabiliza a la proteína PSEN1 [82, 98]
2. La proteína Pen-2 se incorpora al complejo formado, y forma un complejo mayor estable, dando como resultado la activación de PSEN1, lo que trae como resultado la integración de todo el complejo que funciona como γ -secretasa (Fig.9) [82].

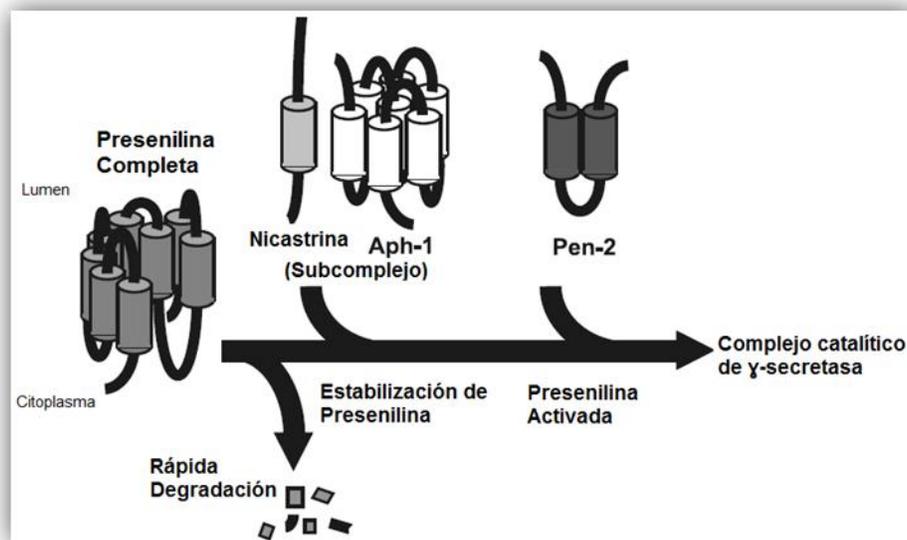


Figura 8. Formación del complejo catalítico γ -secretasa. Tomada y modificada de Wakabayashi T. *et al.* [82]

3.2.8.7. Función patológica.

Las mutaciones que presenta el gen *PSEN1* llevan, a que se vea alterada la relación del péptido β -amiloide (β_{42}/β_{40}), el cual es un factor crítico en la enfermedad, ya que altera la tendencia del $A\beta$ hacia la formación de las placas seniles. Este tipo de mutaciones alteran las características del complejo γ -

secretasa y su interacción con la PPA, lo que lleva al incremento en la formación del $\beta 42$ [54, 60, 79].

Se ha demostrado que las mutaciones en *PSEN1* solo causan una reducción en la actividad catalítica de γ -secretasa, sin que estas lleven a la pérdida de la proteína [100, 101, 102].

Diversas líneas de investigación señalan que la proteína PSEN1, se ve involucrada en la regulación de la apoptosis o estrés celular, a consecuencia de la masiva pérdida neuronal observada en la EA. Las mutaciones en el gen *PSEN1* pueden llevar al estrés del retículo endoplasmático, lo que conduce a una exacerbada liberación de calcio en este organelo, sensibilizando a las neuronas hacia cualquier estímulo apoptótico. [60, 69].

No solo la proteína PSEN1 participa en la generación del $A\beta 42$, sino que también es un componente esencial en la vía de señalización Notch. Esta vía de señalización constantemente mantiene a los precursores celulares en división, y en un estado menos especializado, por lo que si hay una sobre activación de esta vía, se puede llevar al cáncer. Por lo que el complejo γ -secretasa juega un papel importante, ya que se encarga de bloquear la sobre activación de esta vía, y si se ve afectado el complejo provoca cambios en la proteína PSEN1, que pueden conducir al desarrollo de cáncer de piel, entre otros [79, 100, 101, 102].

3.3. Demencia Frontotemporal.

La Demencia Frontotemporal (DFT) es un término descriptivo, el cual se usa para referirse a un desorden caracterizado por un deterioro de los lóbulos frontales y anteriores del cerebro. Esta enfermedad se encuentra caracterizada, por 3 características clínicas: Cambios en la personalidad, demencia semántica y afasia progresiva no afluente [103].

3.3.1. Epidemiología.

Entre la edad de 45 a 65 años, la prevalencia de la enfermedad es de 10 a 30 personas por cada 100,000. Esta enfermedad es considerada como demencia presenil, donde se ha encontrado que individuos menores a los 65 años, representan del 20-25% de todos los casos, mientras que la vida media de los pacientes es de 6 a 11 años, desde la aparición de los síntomas y de 3 a años, después del diagnóstico. Todos estos datos nos indican que esta enfermedad es la segunda más común después de la Enfermedad de Alzheimer [103, 104].

3.3.2. Características clínicas.

Los pacientes pueden ser clasificados dentro de 3 diferentes síndromes clínicos, dependiendo de aparición y prevalencia de los síntomas:

a) Cambios de personalidad, ligados a la demencia frontotemporal

(bvDFT): Aquellos pacientes, que presentan este tipo de síndrome, presentan un cambio marcado en la personalidad y su comportamiento, constantemente presentado tanto apatía como una desinhibición. La apatía que presentan estos individuos se ve caracterizada, por un olvido de los asuntos personales y sus responsabilidades, mientras la enfermedad va progresando se observa un desinterés de la persona, por su higiene personal, así como un descontrol de los esfínteres. Lo que caracteriza a la

desinhibición que presentan estos individuos, es un comportamiento social inadecuado, como la búsqueda de peleas o comportamientos sociopáticos (robo, violación de las leyes). Todo esto lleva a que el individuo presente un grave deterioro social [103, 104, 105, 106].

- b) Demencia semántica (DS):** Los pacientes que presentan este tipo de síntoma, muestran una pérdida progresiva de la semántica, lo que quiere decir que hay una pérdida de los conceptos a cerca de las palabras u objetos. Los pacientes presentan deficiencia en la comprensión de las palabras, conduciendo a que el paciente pierda vocabulario. Sin embargo la fluencia y sintaxis de los pacientes no presenta ningún deterioro [103, 104, 105, 106].
- c) Afasia Progresiva no afluyente (PNFA):** Es un desorden en la expresión del lenguaje, debido a que los individuos que presentan este síntoma, pierden la habilidad para hablar con fluidez. En las primeras etapas en paciente, habla menos de lo normal y con oraciones más cortas. Mientras la enfermedad progresa, los pacientes presentan dificultad para encontrar palabras que expresen lo que piensan, provocando que enmudezcan [103, 104, 105, 106].

3.3.3. Característica neuropatológicas.

Muchos de los casos pueden ser subclasificados en dos grandes categorías que se encuentran basadas en la presencia o ausencia de inclusiones específicas: DFT con inclusiones de tau (DFT-TAU) y DFT con inclusiones tau negativa pero ubiquitina y TDP-43 positiva (DFT-TDP) [103, 104].

- a) DFT-TAU:** La DFT relacionada a la proteína tau es clasificada en base a las características morfológicas y bioquímicas de las inclusiones tau positivas. La enfermedad de Pick caracteriza a las Taupatías de DFT, la cual se caracteriza por la presencia de inclusiones de Pick, éstas son inclusiones redondas u ovaladas, que se encuentran en el citoplasma de las neuronas, principalmente en la neocorteza frontal y temporal del cerebro. Los

pacientes que presentan mutaciones en el gen *MAPT* muestran las características patológicas de la enfermedad de Pick. En el cerebro adulto humano se encuentran 6 isoformas de la proteína tau, tres de estas isoformas están compuestas por tres repeticiones (3R), mientras que las tres restantes se encuentran compuestas por 4 repeticiones (4R), estas repeticiones van a depender del corte y empalme (splicing alternativo) del exón 10 que compone al gen *MAPT*. La relación que existe en un cerebro normal de las isoformas 3R/4R es igual, si se presenta una patología asociada a tau hay un desbalance en esta proporción, conduciendo a la inhabilidad de la proteína tau para unirse a los microtúbulos provocando la formación de las inclusiones [103, 104, 107, 108].

- b) DFT-TDP:** La patología de los pacientes con DFT tau negativa, presenta inclusiones compuestas por ubiquitina (DFT-U). Hace algunos años se encontró que la mayoría de la proteína estaba ubiquitinada en la mayoría de los cerebros con DFT-U era TDP-43. TDP-43 es una proteína altamente conservada involucrada en la transcripción del DNA y el corte y empalme. Bajo condiciones patológicas la proteína TDP-43 es desplazada del núcleo de la célula al citoplasma, donde es hiperfosforilada, ubiquitinada y cortada para producir fragmentos carboxilo terminal. Este tipo de inclusiones se encuentran en casos familiares asociados a mutaciones en el gen *GRN* y *VCP*. Este tipo de inclusiones se encuentran principalmente en el hipocampo y en la corteza frontotemporal [103, 104, 109, 110].
- c) DFT con inclusiones hechas por fusión del sarcoma:** Del 5 al 20% de los casos de DFT-U, no presentan inclusiones de la proteína TDP-43. La inclusiones que presentan estos pacientes, consisten de la proteína fusionada en el sarcoma (FUS), ésta proteína se encuentra ubiquitinada regulando la expresión génica y la translocación de los cromosomas. Las inclusiones que se presentan son similares en morfología y distribución a las inclusiones de TDP-43 [103, 104, 108].

3.3.4. Etiología y genética de la Demencia Frontotemporal.

Del 40 al 50% de los pacientes con DFT, presentan una historia familiar, y al menos del 10 al 50% de esto pacientes presentan un patrón de herencia autosómico dominante [103].

El estudio genético en los pacientes ha llevado a la identificación de 5 genes que al estar mutados, llevan al desarrollo de la DFT.

- El gen de la Progranulina (*GRN*) que se encuentra localizado en la región cromosómica 17q21.32, conformado por 13 exones, de los cuales 1 de ellos es no codificante, este gen explica del 10 al 25% de todos los casos de DFT que presentan un patrón de herencia autosómico dominante [111, 112, 113, 114].
- El gen que codifica para la proteína tau (*MAPT*), el cual se encuentra localizado en la región cromosómica 17q21.1, conformado de 13 exones de los cuales 3 sufren splicing alternativo (Exón 2, 3 y 10), y otros 3 se transcriben muy raramente (exón 4a, 6 y 8). Este gen explica de un 5 a un 20% de los casi de DFT [111, 112, 113, 114].
- El gen que codifica a la proteína que contiene valosina (*VCP*), este gen se encuentra localizado en la región cromosómica 9p13.3, conformado de 17 exones codificantes, este gen se encuentra involucrado en menos del 1% de los casos de DFT [111, 112, 113, 114].
- El gen que codifica a la proteína multivesicular 2B (*CHMP2B*), que se encuentra localizado en la región cromosómica 3p11.2, conformado de 6 exones codificantes. Se encuentra involucrado en menos del 1% de los casos de DFT [111, 112, 113, 114].
- El gen *C9orf72* es de reciente descubrimiento, se encuentra en localizado en la región cromosómica 9p21, el cual está compuesto por 11 exones, y se

ha visto que se encuentra involucrado en un 25% de los casos con DFT, aunque hace falta un mayor estudio de este gen [111, 112, 113, 114].

3.3.4.1 GRN

En este gen se han identificado 114 mutaciones [65]. Estas mutaciones se encuentran distribuidas en toda la región codificante y sitios de splicing del gen. Este gen codifica para una proteína de 593 aminoácidos. Las mutaciones en este gen, llevan a una haploinsuficiencia o pérdida de la función de la proteína. Un posible mecanismo por el cual la pérdida de la proteína lleva a una neurodegeneración, por una inadecuada respuesta al daño neuronal. Existe otro mecanismo que relaciona a la proteína con TDP-43, el cual dice que la supresión de la proteína influye sobre el corte patológico de TDP-43 vía caspasa-3, lo que conduce al movimiento de esta proteína del núcleo al citoplasma [107, 112, 114]. En la tabla 5 se muestra el número de mutaciones puntuales en cada uno de los exones así como el número de familias donde se ha identificado cada una de acuerdo a la base de datos *Molgen* [75].

Tabla 5. Mutaciones puntuales en el gen *GRN*. Tomada y modificada de <http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/>. [75]

	No. de mutaciones	No. de familias
Intrón 1	2	11
Exón 2	7	20
Intrón 2	1	2
Exón 3	4	8
Intrón 3	1	1
Exón 4	1	3
Exón 5	6	15
Intrón 5	1	2
Exón 6	2	2
Exón 7	2	7
Intrón 7	4	24
Exón 8	3	38
Intrón 8	2	3
Exón 9	7	9
Intrón 9	1	1
Exón 10	11	15
Exón 11	7	17

3.3.4.2. MAPT

Este gen codifica a la proteína tau, la cual se encuentra involucrada en la estabilización de los microtúbulos, contribuyendo al mantenimiento de la estructura celular, y al tráfico de moléculas en el axón. Hasta el momento se han identificado 76 mutaciones. Las mutaciones en este gen afectan a la proteína tau, disminuyendo la unión de esta hacia los microtúbulos, debido a un incremento en la expresión de la isoforma 4R, por lo que se ve afectada la plasticidad neuronal, y el transporte axonal a través de los microtúbulos. Además la proteína mutante puede incrementar la afinidad de esta a auto agregarse en filamentos e inclusiones insolubles, las cuales son neurotóxicas [107, 112, 113].

3.3.4.3. VCP

Este gen codifica una proteína de 806 aminoácidos, hasta la fecha se han identifica 17 mutaciones en 41 diferentes familias. Las mutaciones en este gen afectan a las estructuras autofágicas y su maduración, lo que contribuye a formación de inclusiones miopáticas, asociada con la enfermedad de Paget del hueso [111, 112]

3.3.4.4 CHMP2B.

Este codifica una proteína de 213 aminoácidos, en el cual se han identificado 11 mutaciones. La proteína que es codificada por este gen, se encuentra formando parte del complejo endosoma-lisosoma, y en el mecanismo autofágico de la degradación de proteínas. Las mutaciones en este gen, se encuentran asociadas a un engrandecimiento de las vacuolas, en las neuronas corticales debido a una mala fusión del complejo endosoma-lisosoma, y un descontrol de la autofagia [112].

3.3.4.5. C9orf72

El análisis posicional de genes identificó una secuencia expandida no codificante de un hexanucleótido repetido (GGGGCC) en *C9orf72*. En la población normal el expandido está compuesto de 3 a 25 unidades, el cual se expande hasta 60 unidades en pacientes. La expansión del repetido resulta conduce a la pérdida de uno de los transcritos alternativos y conduce a la formación de miRNA nuclear, sugiriendo que un mecanismo complejo en el desarrollo de la enfermedad [111, 113, 114].

3.3.5. GRN

En el año 1998 los estudios de linaje y de mutaciones, en diferentes familias que presentaban un patrón de herencia autosómico dominante, llevó a la identificación de mutaciones en el gen *MAPT*. Inexplicablemente las mutaciones en *MAPT* solo podían ser identificadas en pacientes con inclusiones tau positivas. En el año 2004 varias mutaciones fueron identificadas en el gen *VCP* y un año después se descubrieron mutaciones en el gen *CHMP2B*. A pesar de la identificación de los dos genes, estos no explicaban la enfermedad de 7 familias que se encontraban ligadas a la región cromosómica 17q21 (Fig. 9), esto sugirió que un segundo gen localizado en esta región se encontraba asociado. El análisis sistemático de mutaciones de genes candidatos, llevó a la identificación de mutaciones en el gen *GRN* [113, 115]

Este gen se localiza en la región cromosómica 17q21.32 (Fig.10), lo conforman 13 exones, de los cuales uno de ellos es no codificante. Este gen codifica 7.5 péptidos de Granulina (paragranulina y granulina A-G), separados por secuencias de unión de diferente longitud que son precedidas por una secuencia señal, que permite el transporte a través del mecanismo de secreción y la proteína para la

que codifica recibe el nombre de Progranulina (PGRN). El tamaño completo de la proteína es de 593 aminoácidos y un peso aproximado de 63.5KD (Fig.11) [112, 113, 115].

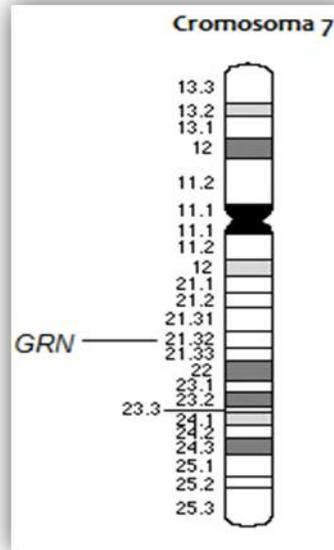


Figura 9. Localización del gen *GRN* en la región cromosómica 17q21.32. Tomada y modificada de <http://www.biologia.uniba.it> [116]

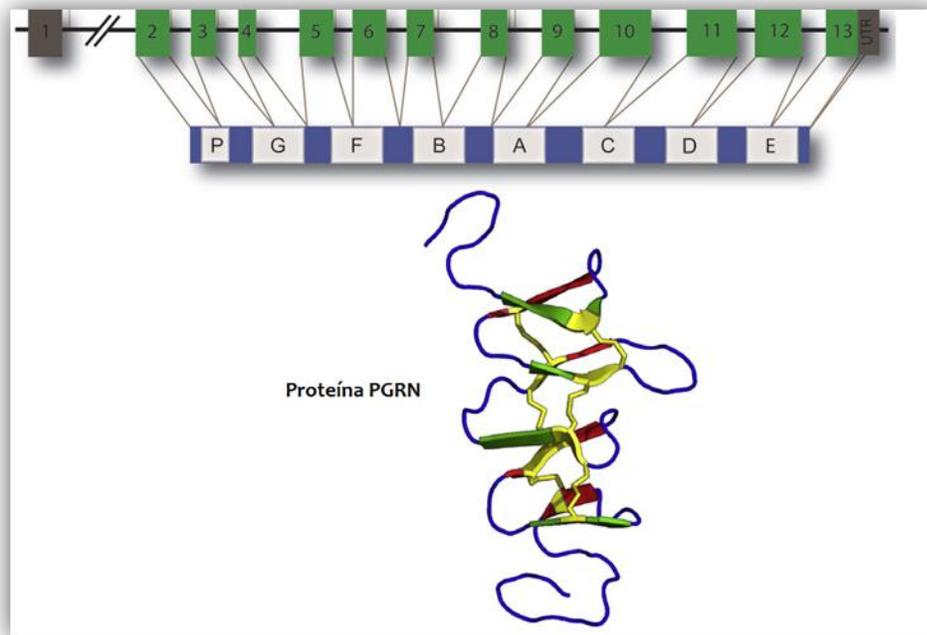


Figura 10. En la parte superior se representa la organización modular del gen *GRN*. En la parte inferior se representa de manera esquemática y tridimensional la proteína que codifica el gen *GRN* (Progranulina). Tomada y modifica de Nicholson A. M., *et al.* y Smout M. J., *et al.* [115 y 117]

3.3.5.1. Funciones biológicas de PGRN.

En el tejido periférico PGRN es cortada para la obtención de granulina (6KD). Este proceso proteolítico es regulado por un inhibidor de la secreción de proteasa leucocítica (SLPI), el cual previene el corte ya sea uniéndose a PGRN o antagonizando la función de la elastasa [118, 119, 120].

La expresión de la proteína ocurre en diferentes tejidos, incluido el epitelial, inmune y neuronal. La proteína PGRN se ve involucrada en diferentes procesos biológicos como en la progresión del ciclo celular, en la regulación del ciclo celular, sanación de las heridas y en la inflamación. También se ha encontrado que se encuentra asociada a la tumorigénesis, actuando como un agente anti-inflamatorio mientras que las granulinas tienen un papel pro-inflamatorio [118, 119, 120].

La expresión del gen se encuentra regulada por inteleucina-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) [118, 119, 120].

a) Función de PGRN en el Sistema Nervioso Central.

La proteína PGRN se encuentra ampliamente expresada en el sistema nervioso central durante el desarrollo neuronal, y es requerida para la diferenciación sexual del neonato. En el cerebro normal de un adulto humano, esta proteína se encuentra expresada en el hipocampo [118, 119].

b) Neuroinflamación.

La expresión de PGRN se ve significativamente incrementada en las enfermedades neurodegenerativas. Muchos de los estudios revelan que PGRN se encuentra positivamente regulada dentro del sistema nervioso central debido a la neuroinflamación. Si la microglía que es el mecanismo de defensa inmunológica del sistema nervioso central, se encuentra activa durante un largo periodo de tiempo ésta es capaz de causar daño cerebral, a través de la generación de citocinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno, por lo que PGRN

puede funcionar como un inmuno-modulador al disminuir el exceso en la activación de la microglía [118, 119, 120, 121].

3.3.5.2. Mutaciones en *GRN*.

Las mutaciones identificadas en este gen se han sido asociadas a daño en el lóbulo frontal temporal e inferior del cerebro, y a nivel molecular se encuentran inclusiones principalmente tau negativas y ubiquitina positivas. Todas las mutaciones patogénicas llevan a la reducción o haploinsuficiencia en los niveles de PGRN, aunque la manera en la que esto ocurre es diferente en cada caso. Las mutaciones que cambian el sitio de splicing previenen el tránsito de PGRN, llevando a la degradación de esta. Las mutaciones sin sentido ocasionan haploinsuficiencia, mediante la introducción de un codón de paro, conduciendo al decaimiento del RNA y una pérdida del 50% de la función de la PGRN [118, 119, 120].

Las mutaciones en el gen *GRN* llevan al desarrollo de inclusiones de TDP-43, aunque el mecanismo por el que esto se lleva a cabo no ha sido completamente caracterizado. Estudios en linajes celulares, llevaron al desarrollo de la siguiente hipótesis: La deficiencia de PGRN lleva a la degradación de TDP-43 mediante caspasa-3, esto genera 2 fragmentos con un peso molecular aparente de 25 kD y 35 kD respectivamente, el fragmento de 25 kD puede inducir la toxicidad celular, mediante la formación de inclusiones insolubles, hiperfosforiladas y ubiquitina positivas, lo que lleva a la acumulación causando una disfunción celular mediante la interferencia del transporte intracelular [119, 122, 123, 124].

También se ha observado que el nivel bajo de PGRN en neuronas lleva a una reducida supervivencia de éstas ante situaciones de estrés. El factor de crecimiento neural o nervioso (proNGF), causa la apoptosis neuronal mediante uniones simultáneas a sortilina y al receptor transmembranal p75^{NTR}, las células que carecen de sortilina son inmunes a la apoptosis mediada por proNGF. Dada la afinidad de PGRN hacia sortilina se cree que regula la supervivencia neuronal, mediante esta vía. Sin embargo, se encontró que los sitios de unión de sortilina

hacia PGRN son diferentes los que tiene con proNGF, por lo que hacen falta más estudios para caracterizar esta vía [123, 124].

Diferentes estudios han demostrado que PGRN puede regular directamente la señalización intracelular mediante la unión directa y específica hacia el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) e inhibiendo el mecanismo mediado por TNF- α . Esto conduce a la hipótesis de que la disminución en los niveles de PGRN junto con cualquier enfermedad benigna, conduzca a un estado pro-inflamatorio, llevando a la muerte neuronal, pero esta hipótesis deberá corroborarse [122, 123, 124].

IV. Diseño experimental.

En la Figura 12 se muestra un diagrama de la metodología empleada, más adelante se detalle cada uno de los pasos.



Figura 11. Metodología General.

Población de estudio.

Pacientes.

Se analizaron 44 pacientes con probable diagnóstico de demencia tipo Alzheimer y 16 muestras con probable diagnóstico de demencia frontotemporal, que fueron atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNNMVS). Se incluyeron 60 controles sanos mayores de 60 años, sin antecedentes de enfermedades neurodegenerativas.

Criterios de inclusión.

Individuos con diagnóstico clínico de probable de demencia tipo Alzheimer o demencia frontotemporal, que aceptaran participar en el estudio previo consentimiento informado.

Criterios de exclusión.

Individuos que no cumplan criterios clínicos de diagnóstico probable de demencia tipo Alzheimer o demencia frontotemporal y que no hayan aceptado participar en el estudio.

Toma de muestra.

La obtención de sangre periférica se realizó mediante una venopunción, utilizando un tubo vacutainer con capacidad de 6 mL, que cuenta con una solución de dextrosa y ácido cítrico como anticoagulante. Las muestras fueron preservadas a 4°C, hasta el momento de su uso.

Extracción de DNA genómico a través de la metodología de sales Miller.

1. A un tubo Falcon de 15 mL se transfieren 3 mL de sangre periférica después se adiciona una solución Buffer para lisis de glóbulos rojos (BLGR). Se homogenizó por inversión. Se centrifugó a 3000 rpm durante un lapso de 6 minutos. El sobrenadante se desechó. Posteriormente se agregó 1 mL de BLGR al botón, este se homogenizó y se transfirió a un tubo de reacción con capacidad de 1.5 mL.
2. El homogenizado se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante se desecho. Este paso se repitió hasta que el botón aparentemente se encuentre limpio o libre de hemoglobina.
3. Al botón se le adicionan 570 μ L de una solución de NaCl al 5 mM y se homogenizó. Después se adicionaron 40 μ L de una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% y se homogenizó. Por último se adicionaron 200 μ L de una solución de NaCl al 7M y se homogenizó, se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de reacción de 1.5 mL.
4. Al tubo de reacción donde se encuentra el sobrenadante se adicionan 700 μ L de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Se homogenizó el tubo y se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 mL.
5. Al tubo donde se encuentra la fase acuosa, se adicionaron 900 μ L de etanol absoluto frío, se homogenizó y se centrifugó a una velocidad de 14000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó. Al botón se le adicionaron 700 μ L de etanol al 70%. Se homogenizó y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y el botón se secó en un concentrador al vacío durante 30 minutos aproximadamente.
6. El botón se resuspendió en 250 μ L de agua estéril, después se mantuvo en agitación constante a 60°C durante 2 horas. La muestra de DNA se conservó a -20°C.

Cuantificación de la muestras de DNA.

La determinación de la concentración de DNA, se realizó mediante espectrofotometría (se utilizó un NanoDrop 2000) a una longitud de onda de 260 nm. También se determinó la relación A_{260}/A_{280} para conocer la pureza de las mismas.

El equipo que se utilizó para determinar la concentración de DNA fue el NanoDrop 2000, en este equipo el blanco se ajusto con agua inyectable, posteriormente se eligió la opción de lectura de DNA de doble cadena, mediante la opción que aparece en el equipo.

Análisis de la integridad del DNA.

Dicho análisis se realizó por medio de electroforesis, empleando un gel de agarosa al 1%.

El gel de agarosa se elaboro empleando la siguiente metodología:

1. En una balanza analítica se pesó 1g de agarosa por cada 100mL de buffer TBE 1x (Tris, ácido bórico. EDTA).
2. La mezcla de agarosa y TBE se calentó, hasta que se formó una solución homogénea.
3. A esta mezcla se le adicionó 1 μ L de Bromuro de etidio (10mg/mL) por cada 100 mL de solución y se homogenizó.
4. La mezcla anterior se vertió en un molde y se colocaron los peines que formaron los pozos en los que se cargó la muestra de DNA a analizar.
5. La mezcla se dejó solidificar a temperatura ambiente por una hora, para formar un gel de agarosa y se retiraron los peines.

La electroforesis se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. El gel de agarosa se colocó en una cámara de electroforesis, y se adicionó buffer TBE 1x hasta cubrir por completo el gel o llegar a la marca especificada en la cámara.

2. Se tomó un volumen de 2.0 μL de muestra de DNA y se mezcló con 2.0 μL de amortiguador de carga 10x (azul de bromofenol, glicerol, Xilencianol).
3. La mezcla anterior se depositó en cada uno de los pozos del gel. Este paso y el anterior se realizó para cada una de las muestras a analizar.
4. La electroforesis se realizó a 100 V, durante 30 minutos.
5. El gel se colocó en un transiluminador de luz UV y se tomó una fotografía, mediante el uso de un fotodocumentador, para su análisis.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de los exones 4-12 del gen *PSEN1* se realizó a través de DNA genómico con oligonucleótidos previamente descritos [125] y los 12 exones del gen *GRN*, se amplificaron mediante la utilización de oligonucleótidos que flanquearan esta región. Las secuencias de los oligonucleótidos, se presentan en el anexo final en la sección de reactivos.

En la Tabla 6 se muestran los reactivos utilizados en la PCR del gen *PSEN1* así como la concentración y el volumen necesario para cada reacción.

En la Tabla 7 se muestran los reactivos utilizados en la PCR del gen *GRN* así como la concentración y el volumen necesario para cada reacción.

Tabla 6. Reactivos utilizados en la PCR del gen *PSEN1*.

Reactivo	Concentración	Volumen
DNA	100 ng/ μL	3.0 μL
<i>Master Mix</i>		10.0 μL
Oligonucleótido sentido	25 μM	1.0 μL
Oligonucleótido antisentido	25 μM	1.0 μL
Agua libre de DNasas		15.0 μL
Volumen Final.		30.0 μL

Tabla 7. Reactivos Utilizados en la PCR del gen GRN.

Reactivo	Concentración	Volumen
DNA	100 ng/μL	2.5 μL
<u>Master Mix</u>		12.5 μL
Oligonucleótido sentido	10 μM	0.5 μL
Oligonucleótido antisentido	10 μM	0.5 μL
Agua libre de DNAsas		9.0 μL
Volumen Final.		25.0 μL

Las condiciones empleadas para la PCR del gen *PSEN1*, previamente estandarizadas, se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones generales de la PCR, para los exones del gen *PSEN1*. Se varía la temperatura de alineamiento de acuerdo a la T_m de cada par de oligonucleótidos

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	15 min
Desnaturalización	94°C	30 seg
Hibridación	52°C	30 seg
Elongación	72°C	45 seg
Elongación Final	72°C	5 min
Conservación	4°C	∞

Repetir por 35 ciclos.

Las condiciones empleadas para la PCR del gen *GRN*, fueron previamente estandarizadas (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones de la PCR para los exones del gen *GRN*.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	15 min
Desnaturalización	94°C	1 min
Hibridación	55°C	1 min
Elongación	72°C	1min 15 seg
Elongación Final	72°C	10 min
Conservación	4°C	∞

Repetir por 35 ciclos.

Resolución de los productos de la PCR.

Para analizar la integridad y el tamaño de los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.5%/TBE 1x.

Purificación de los productos de la PCR.

La purificación de los productos de PCR, se realizó empleando el estuche comercial de purificación *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega®*). La metodología empleada fue la siguiente:

1. Se adicionó un volumen de solución de unión a membrana igual al de la reacción de PCR y se homogenizó.
2. Se inserta una minicolumna SV a un tubo colector.
3. La mezcla que se obtuvo, en el primer paso se transfirió a la minicolumna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto.
4. La columna se centrifugó a 16,000 x g por 1 minuto. Se desechó la solución que se depositó en el tubo colector y la minicolumna se reinsertó en este.

5. Se adicionaron 700 μL de una solución de lavado de membrana a la minicolumna SV. El tubo se centrifugó a 16,000 x g por 1 minuto. Se desechó la solución que se depositó en el tubo colector y la minicolumna se vuelve a colocar sobre el tubo colector.
6. El paso 5 se repitió adicionando ahora 500 μL de solución de lavado de membrana. Se centrifugó a 16,000 x g por 5 minutos.
7. Se desechó la solución que se depositó en el tubo colector y la minicolumna se reinsertó en este, y se centrifugó por un minuto.
8. Se transfirió la minicolumna a un tubo de 1.5 mL.
9. Se adicionó un volumen de 30 μL de agua libre de nucleasas. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Después se centrifugó a 16,000 x g por un minuto.
10. El filtrado se conservó a 4°C, hasta su uso.

Reacción de secuenciación.

La reacción de secuenciación se llevó a cabo empleando el estuche comercial de secuenciación *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®). Los reactivos, las concentraciones de estos y los volúmenes que se utilizaron así como las condiciones empleadas para realizar la reacción, se resumen en la Tabla 10 y 11 respectivamente.

Tabla 10. Reactivos empleados en la reacción de secuenciación.

Reactivo	Concentración	Volumen
Oligonucleótido	25 μM	1 μL
Amortiguador	5X	3.5 μL
<i>BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing</i>		1 μL
Agua libre de DNasa		12.5 μL
Producto de PCR	~100 ng/ μL	2 μL
Volumen final de reacción		20 μL

Tabla 11. Condiciones de la reacción de secuenciación.

Fase	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	96°C	5 min
Desnaturalización	95°C	30 seg
Hibridación	50°C	30 seg
Elongación	60°C	45 seg
Elongación final	72°C	5 min
Conservación	4°C	∞

} Repetir por 25 ciclos.

Purificación de los productos de la reacción de secuenciación.

La purificación de los productos de secuenciación se hizo con columnas de purificación *Centri-Sep*, utilizando la siguiente metodología:

1. Se adicionó un volumen de 750 μ L de agua estéril, a una columna *Centri-Sep* para hidratarla, después se eliminan las burbujas.
2. Las columnas se conservaron en refrigeración a 4°C durante 2 horas.
3. Una vez hidratadas se quitan las tapas de la columna para drenar el líquido después se colocan en un tubo colector. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minuto.
4. Se desechó el líquido del tubo colector y nuevamente se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL. para centrifugar igual que en el paso anterior.

Purificación del producto de PCR:

1. El producto de la reacción de secuenciación se aplicó en el centro de la columna, teniendo cuidado de no tocar el gel formado.
2. Se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos.
3. El producto purificado que se obtuvo se secó empleando un concentrador de vacío.

Secuenciación Automatizada.

El producto purificado se hidrato en 15 µL de formamida ultrapura, se homogenizó y se transfirió a una placa de 96 pozos. Se desnaturalizó a 94°C durante 5 minutos, para después analizarlo en un secuenciador de DNA AB3130.

Análisis de las secuencias.

El análisis se realizó mediante el uso del programa *Sequencing Analysis v5.3*

V. Resultados.

5.1 Población de estudio.

La población total estudiada fue de 60 pacientes de los cuales 23 tenían diagnóstico de probable enfermedad de Alzheimer familiar, 14 casos esporádicos y 6 que desconocían antecedentes, así como 16 pacientes con diagnóstico probable de demencia frontotemporal. En la figura 13 y 14 se muestran las distribuciones de las edades y el género de los pacientes, mientras que en la figura 15 se muestra la distribución de la muestra estudiada.

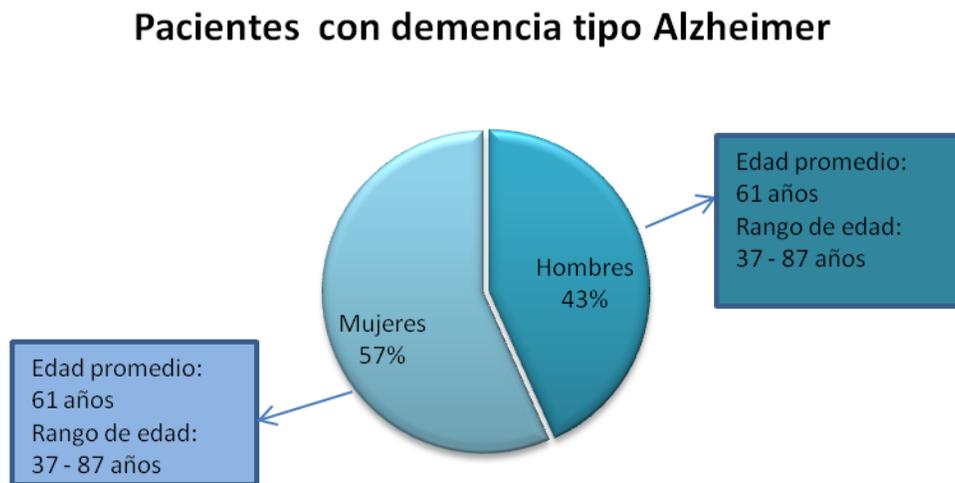


Figura 12. Género y edad de los pacientes con probable diagnóstico de demencia tipo Alzheimer.

Pacientes con demencia Frontotemporal



Figura 13. Género y edad de los pacientes con probable diagnóstico de demencia frontotemporal.

Distribución total de los pacientes

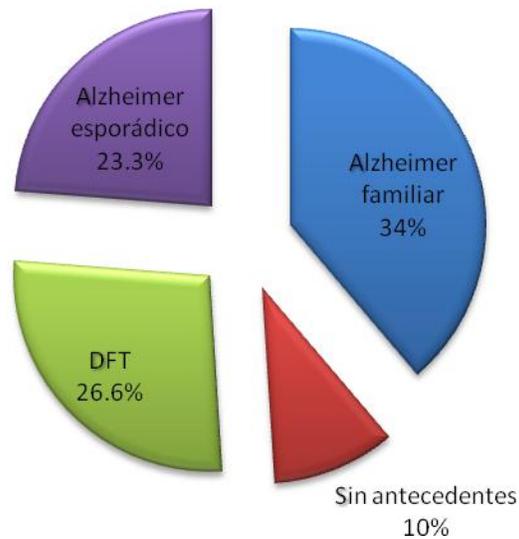


Figura 14. Distribución del total de los 60 pacientes estudiados.

5.2 Cuantificación de DNA genómico.

El DNA de los pacientes analizados, presentó una concentración promedio de 253.107 ng/ μ L (100- 280ng/ μ L), y una relación A_{260}/A_{280} promedio de 1.89.

5.3 Análisis del DNA genómico.

EL DNA que se obtuvo de los pacientes fue íntegro y de alto peso molecular, como se muestra en la figura 15 que es el resultado de una electroforesis horizontal representativa de 14 muestras de DNA y en el primer carril de izquierda a derecha se muestra un marcador de peso molecular en un gel de agarosa al 1%.

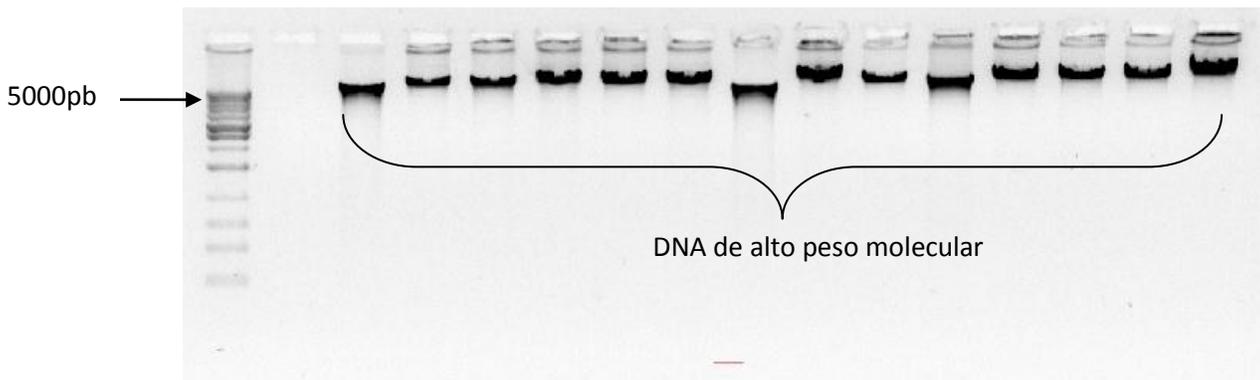


Figura 15. Integridad del DNA genómico.

5.4 Análisis de los productos de PCR.

La amplificación de los exones 4-12 del gen *PSEN1* se realizó a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos previamente descritos [125] que permitieron obtener amplicones de diferentes pesos moleculares correspondientes a cada uno de los exones estudiados que se muestran en la figura 16.

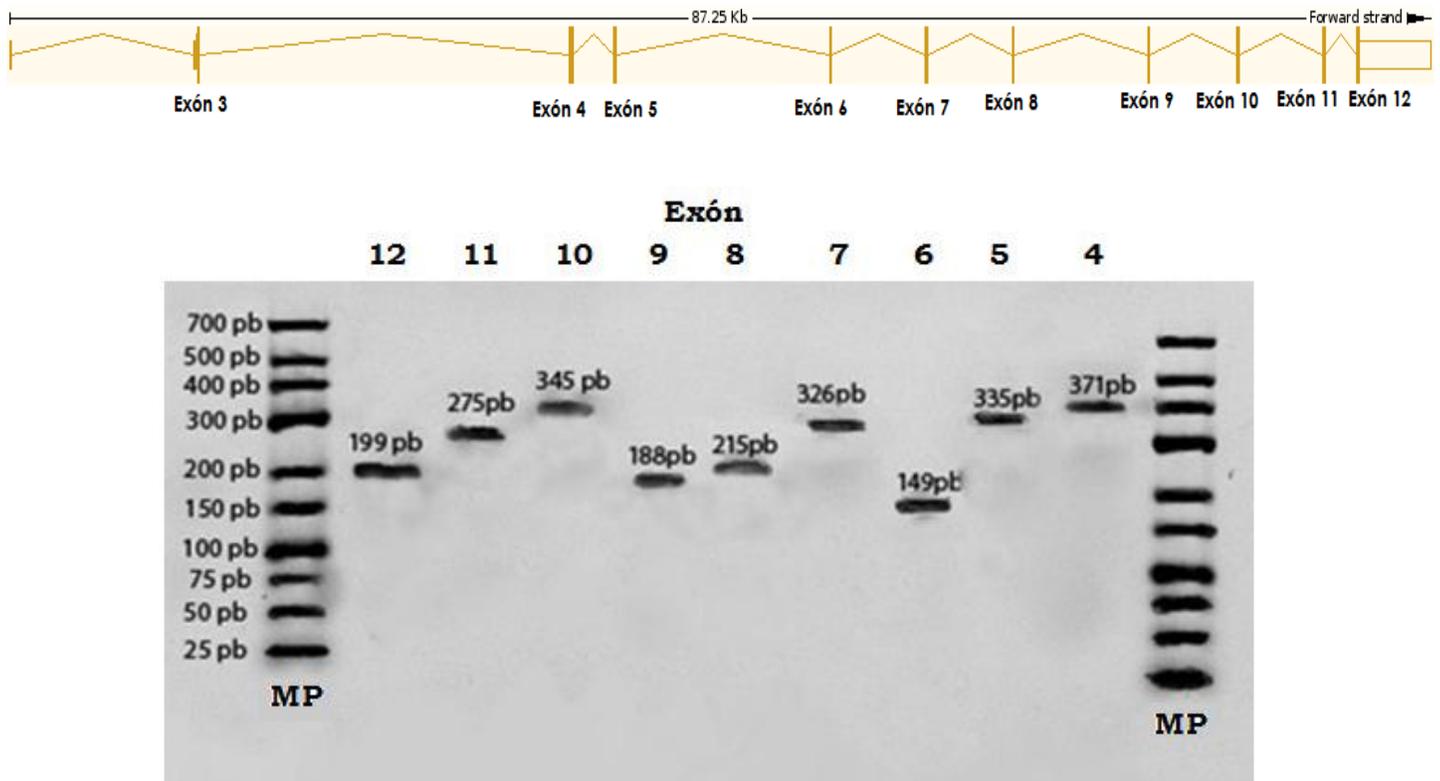


Figura 16. En la parte superior se muestra la estructura modular del gen *PSEN1*. <http://www.ensembl.org> [78]. En la parte inferior aparece la resolución de los Productos de PCR en un gel de agarosa al 2% flanqueados por un marcador de peso molecular (MP) *GeneRuler™ Low Range DNA Ladder* de la marca (*Fermentas*®) donde se muestra del exón 12 al 4 del gen *PSEN1*, y en la parte superior del producto su correspondiente número de pares de base (pb).

Los 12 exones del gen *GRN*, se amplificaron mediante 6 pares de oligonucleótidos (Anexo A) lo que nos permite amplificar más de un exón por reacción de PCR (Figura 17).

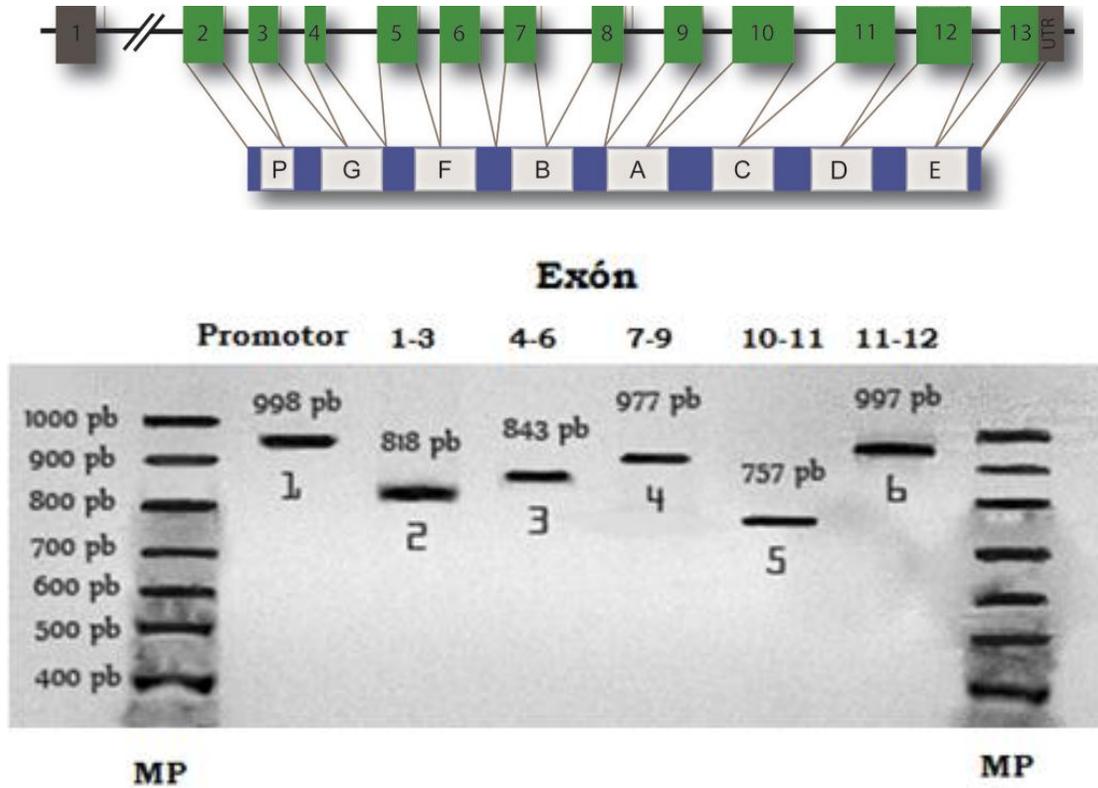


Figura 17. En la parte superior se presenta la imagen modular del gen *GRN*. Tomada y modificada de Nicholson A. M., *et al* [115]. En la parte inferior aparece la resolución de los Productos de PCR flanqueados por un MP (*GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder*) mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El carril 1 muestra el producto amplificado que corresponde a la región promotora, mientras que el carril 2 al 6 se muestran los productos de PCR de los exones 1-3, 4-6, 7-9, 10-11, 11-12 de *GRN* respectivamente, y en la parte superior del producto su correspondiente número de pares de bases.

5.5 Mutaciones encontradas en el gen *PSEN1*.

En el exón 12 de este gen se encontraron 8 pacientes presentando una mutación puntual en el codón 431; en la figura 18 se muestra los electroferogramas parciales de este exón donde se presenta la sustitución de Citosina (C) en el codón GCA por adenina (A) GAA lo que lleva a que haya un cambio de aminoácido, de una alanina por un ácido glutámico (A431E).

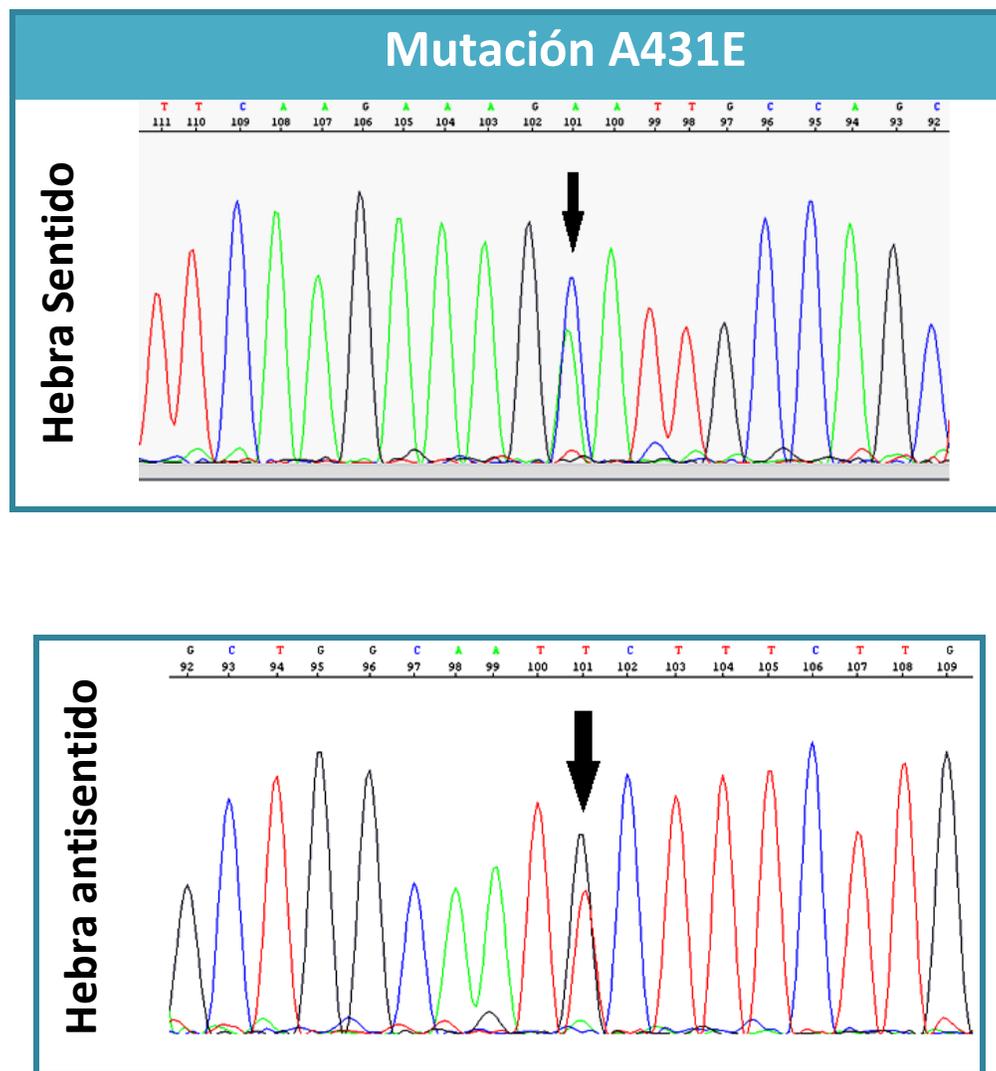


Figura 18. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 12 de *PSEN1*. La flecha señala el cambio que ocasiona la mutación A431E.

En la figura 19 se muestra la secuencia parcial normal y mutada del exón 12 del gen *PSEN1*; específicamente le región donde ocurre la mutación.

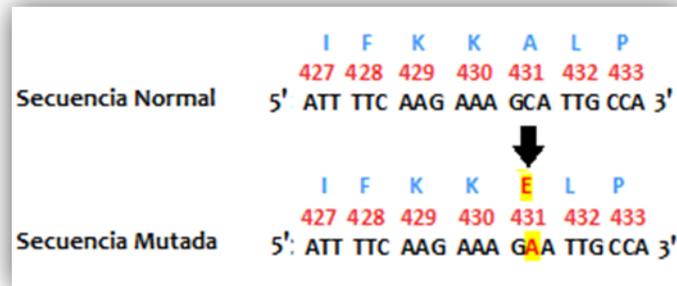
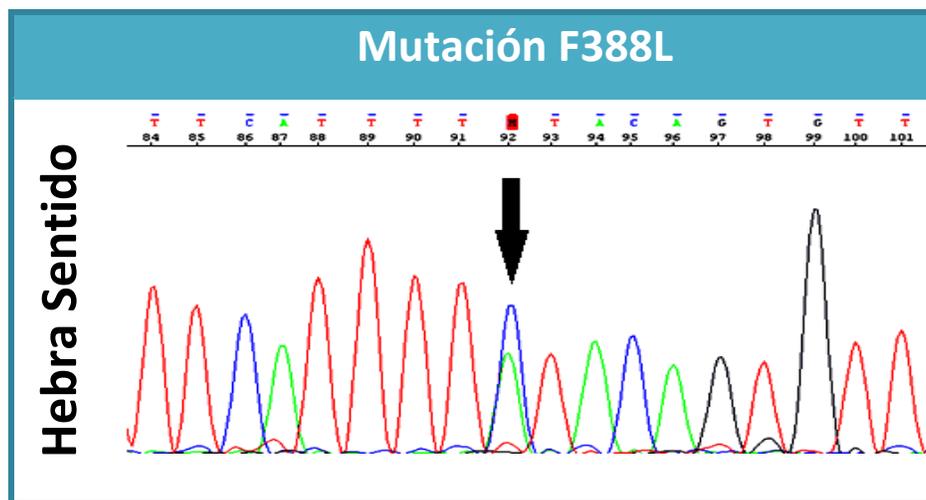


Figura 19. Secuencia parcial normal y mutada del exón 12, donde se ilustra el cambio de nucleótido y aminoácido.

En el exón 11 se encontró un paciente el cual presenta una mutación puntual en el codón 388; en la figura 20 se presentan los electroferogramas parciales de este exón, en donde se observa la mutación puntual. El cambio de una citocina por una adenina, lleva a que haya un cambio de aminoácido, de una fenilalanina por una leucina (F388L).



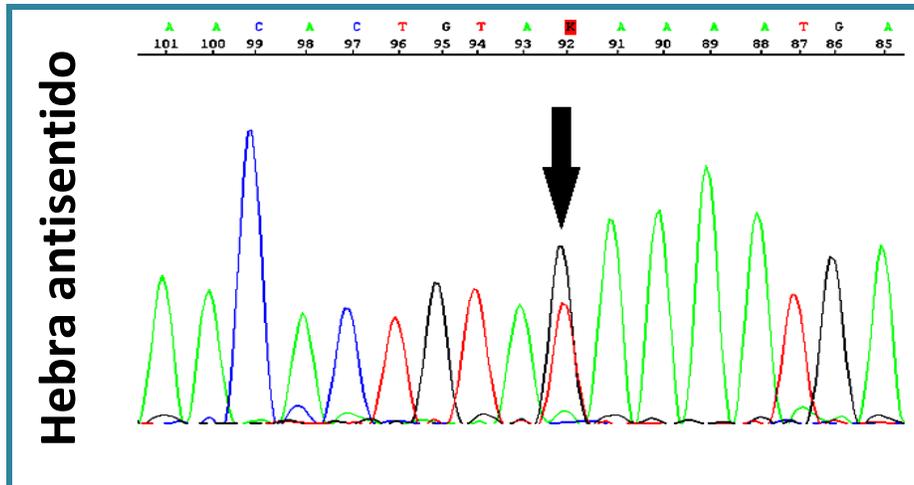


Figura 20. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 11 de *PSEN1*. La flecha señala el cambio que ocasiona la mutación F388L.

En la figura 21 se muestra la secuencia parcial normal y mutada del exón 11 del gen *PSEN1*; específicamente le región donde ocurre la mutación.

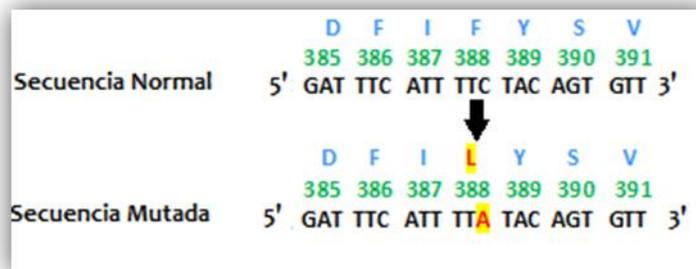


Figura 21. Secuencia parcial normal y mutada del exón 12, de *PSEN1* donde se ilustra el cambio de nucleótido y aminoácido.

En los exones 4 al 10 ningún paciente presentó alguna mutación.

En la tabla 12 se resumen las mutaciones identificadas en *PSEN1* en cada uno de los pacientes.

Tabla 12. Mutaciones identificadas en el gen *PSEN1*.

No de Pacientes	Mutación identificadas en este estudio		
	Cambio de aminoácido	Cambio de nucleótido	Referencia
ALZ 1	A431E	GCA-GTA	rs63750083
ALZ 2	A431E	GCA-GTA	rs63750083
ALZ 3	A431E	GCA-GTA	rs63750083
ALZ 4	A431E	GCA-GTA	rs63750083
ALZ 5	A431E	GCA-GTA	rs63750083
ALZ 6	A431E	GCA-GTA	rs63750083
ALZ 7	A431E	GCA-GTA	rs63750083
ALZ 8	A431E	GCA-GTA	rs63750083
ALZ 9	P388L	TTC-TTA	-----

En la tabla 13 se muestran el lugar de origen de los pacientes a los que se les identificó la mutación A431E.

Tabla 13. Lugar de origen de los pacientes que presentan la mutación A431E en el exón 12 del gen *PSEN1*.

No. de Paciente	Lugar de origen
ALZ 1	Guadalajara
ALZ 2	Michoacan
ALZ 3	Jalisco
ALZ 4	Jalisco
ALZ 5	Michoacan
ALZ 6	Michoacan
ALZ 7	Jalisco
ALZ 8	Se desconoce

5.6 Mutaciones encontradas en el gen *GRN*.

En solo un paciente de los 16 estudiados se identificó la mutación p.Cys31fs (g.90_91ins CTGC) que ya ha sido descrita [65, 127]. La inserción de los cuatro nucleótidos en el exón 2 cambia el marco de lectura. En la figura 22 se muestran los electroferogramas de esta mutación.

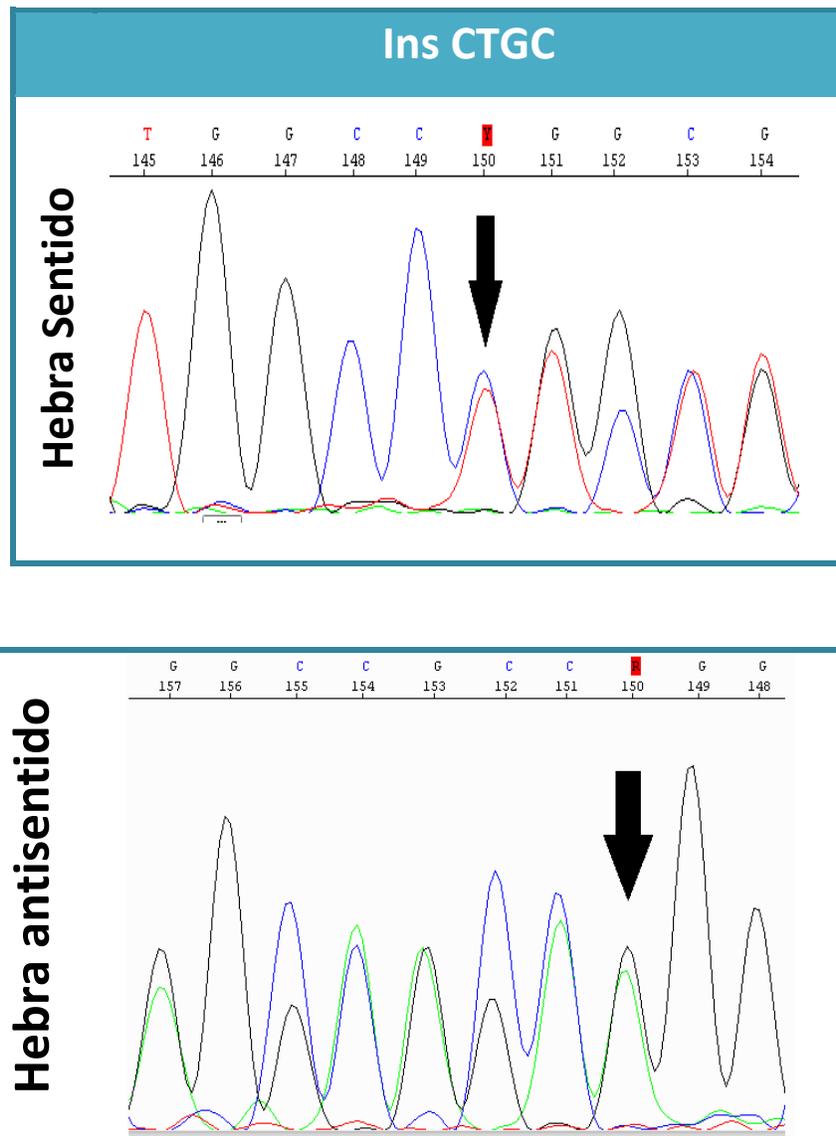


Figura 22. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 2 de *GRN*. La flecha señala el cambio que ocasiona la mutación p.Cys31fs.

En la figura 23 se muestra la secuencia parcial normal y mutada del exón 2 del gen *GRN*; específicamente le región donde ocurre la inserción.

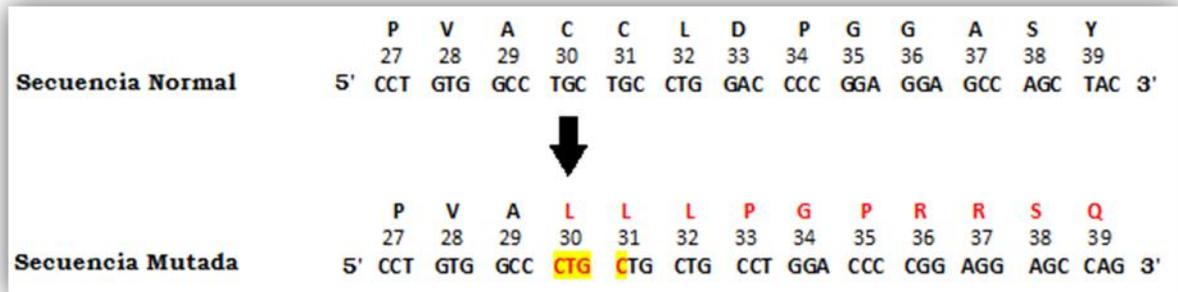


Figura 23. Secuencia parcial normal y mutada del exón 2, de *GRN* donde se ilustra la inserción de los cuatro nucleótidos, como cambia el marco de lectura y el aminoácido.

En los casos restantes no se detectaron mutaciones en *GRN*.

VI. Análisis de resultados y discusión.

Como se mostró en la tabla 11, en 8 de los 46 pacientes con probable diagnóstico de enfermedad de Alzheimer se identificó la mutación A431E en el exón 12 del gen *PSEN1*. Estos 8 casos corresponden a formas familiares de inicio temprano (promedio de edad 48 años, rango: 37-63 años), con un patrón de herencia autosómico dominante y corresponden al 39.1% del total de estas formas familiares. Esta mutación fue reportada previamente por el grupo de trabajo (Yescas y cols. 2006) en 9 familias del estado de Jalisco sugiriendo un efecto de fundador en esta región [128]. Sin embargo 4 de estos nuevos casos pertenecen también al estado de Jalisco y los 4 restantes al estado de Michoacán. Por lo que resultaría importante determinar en ellos, si también presentan un alelo común, lo cual reforzaría este efecto fundador. Es importante considerar que estos casos familiares con patrón de herencia autosómico dominante, existe un 50% de riesgo para la descendencia de heredar esta mutación

El cambio de una adenina por una guanina en el nucleótido 1540, el cual se traduce en el cambio del aminoácido del codón 431 de alanina por ác. Glutámico el cual se encuentra ampliamente conservado entre diferentes especies, además de que en la proteína se encuentra entre el dominio transmembranal 8 y 9. El programa *PolyPhen-2* [129] puede predecir las consecuencias funcionales debidas a un cambio de aminoácido, empleando este programa se encontró que la sustitución A431E podría afectar la función de la proteína *PSEN1* [128].



Esta mutación es probablemente dañina con un valor de **1.000** (Sensibilidad: **0.00**; Especificidad: **1.00**)

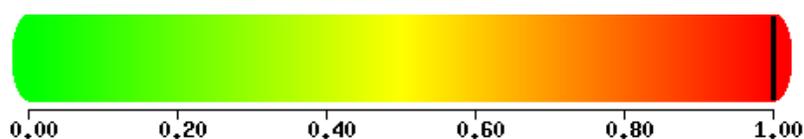
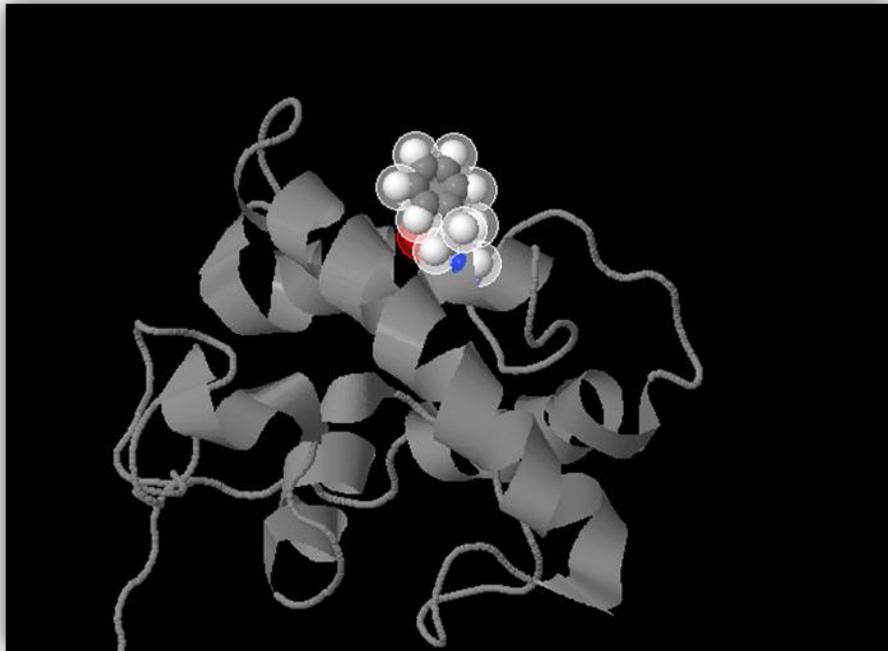


Figura 24. Se muestra la ubicación espacial de la mutación A431E (Protein data base) y en la parte inferior el resultado obtenido a través del programa *PolyPhen v2.0*, la cual fue tomada y modificada. [129, 130]

Como se muestra en la figura 24 el programa *PolyPhen-2* predice que esta mutación es patogénica. El mecanismo por el cual esta mutación ejerce su efecto aún no es claro, pero como se ha mencionado las mutaciones que presenta el gen *PSEN1* llevan, a que se vea alterada la relación del péptido β -amiloide (β_{42}/β_{40}), llevando al desarrollo de la EA [54, 60]. En el paciente ALZ 9 se presentó una mutación no sinónima en el exón 11 en el codón 388 del gen *PSEN1*, donde cambia el aminoácido fenilalanina por leucina localizada en el dominio transmembranal 7, esta mutación es nueva, no ha sido descrita en otras poblaciones, ni en las bases de datos [65, 75]. Para descartar que se tratara de un polimorfismo se analizaron por secuenciación directa 100 cromosomas de controles sanos, y en ninguno de ellos se encontró esta variante por lo que se descarta que sea un polimorfismo. Se analizó la repercusión de esta mutación a través del programa *PolyPhen-2* [129], dando como resultado un probable efecto dañino con un valor de 0.996. (Fig.25).



Esta mutación es probablemente dañina con un valor de **0.996** (Sensibilidad: **0.55**; Especificidad: **0.98**)

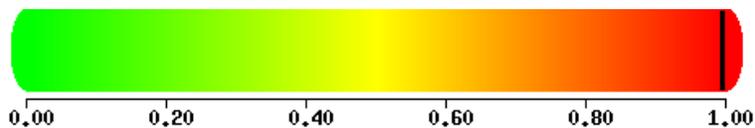


Figura 25. Se muestra la ubicación espacial de la mutación F388L (Protein data base) y en la parte inferior el resultado obtenido a través del programa *PolyPhen v2.0*, la cual fue tomada y modificada [127, 128].

Este residuo se encuentra altamente conservado entre especies, lo cual hace probable que esta mutación sea patológica y para confirmarlo es necesario seguir su segregación en el resto de la familia, siendo necesario realizar ensayos funcionales que nos pudieran confirmar si ésta afecta la función del complejo γ -secretasa lo cual traería como consecuencia la alteración de la relación del péptido β -amiloide (β_{42}/β_{40}), que conduce al desarrollo de la EA [54, 60].

De las muestras de pacientes con DFT, sólo uno presentó mutación debida a una inserción cuatro nucleótidos entre la posición 90-91 (g.90_91ins CTGC) que corresponde al codón 31 (p.Cys31fs) de *GRN*.

Esta mutación ha sido reportada por diferentes grupos de investigación [130-136]. BakerJ. y colaboradores [127] la describieron por primera vez en una familia canadiense (UBC17) con ancestros ingleses. En estudios posteriores, se reportó esta mutación en 4 familias del Reino Unido, mediante análisis de haplotipos en estas familias se determinó un efecto fundador ya que en estas familias se identificó que comparten un ancestro común con la familia UBC17, además estas familias presentan inclusiones ubiquitina positiva [132].

Está descrito que los efectos de esta mutación llevan a la pérdida de la función de la proteína PGRN, desencadenando los diferentes mecanismos antes mencionados por los que esto conduce al desarrollo de la DFT [112, 131].

En nuestra muestra el 16.6% de los pacientes con EA presentó mutación en *PSEN1*, mientras que el 6.25% de los pacientes con DFT presentó mutación en el gen *GRN*.

Los casos restantes negativos para mutaciones en ambos *loci* probablemente portan mutaciones localizadas en otros genes como *PSEN2*, *APP*, *MAPT*, *C9orf72* o en genes aún no identificados.

Actualmente en el INNN se está realizando el estudio de otros genes involucrados en la DFT, con la finalidad de establecer un diagnóstico preciso de los pacientes, y los riesgos para la descendencia.

El realizar el estudio de los genes que causan la EA y la DFT, nos lleva a realizar el diagnóstico definitivo de los pacientes, de esta manera se puede tener un mejor manejo del paciente, lo que permitirá un asesoramiento genético de los riesgos para su descendencia. A conocer mejor los mecanismos que conllevan a estos padecimientos, con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la calidad de vida de estos pacientes que presentan EA o DFT o retrasar sus síntomas, ya que hasta el momento no existe terapia para estas enfermedades.

VII. Conclusiones

Se identificaron las mutaciones A431E en 8 pacientes y la nueva variante F388L en solo un paciente en el gen *PSEN1* lo cual corresponde al 39.1% de formas familiares de inicio temprano de pacientes con demencia tipo Alzheimer.

Solo se identificó mutación en un paciente con DFT en el gen *GRN* que corresponde a una inserción p.Cys31fs (g.90_91ins CTGC) que conlleva a la pérdida de la función de la proteína la cual fue previamente descrita.

En los pacientes que no presentaron mutaciones en ninguno de los genes analizados, no se descarta la posibilidad de que existan otros genes mutados aún no identificados y no los excluye de padecer demencia tipo Alzheimer o fronto temporal.

Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento de las demencias en México, lo que nos permite tener un mejor conocimiento de las mutaciones que las causan y su distribución en la población mexicana.

VIII. Bibliografía.

1. Gabriele C, Dolciotti C, Picchi L, Bonucelli U. Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci* (2011); 32: 275-279.
2. Berchtold N, Cotman C. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer disease: Greco-Roman period in the 1960's. *Neurobiol Aging* (1998); 19: 173-189.
3. Warner, T. T., & Hammans, S. R. (2009). *Practical guide to neurogenetics*. Philadelphia: Ed. Saunders/Elsevier. Primera edición, 24-37.
4. Huff J.S. (2011). Altered Mental Status and Coma. In J.E. Tintinalli, J.S. Stapczynski, D.M. Cline, O.J. Ma, R.K. Cydulka, G.D. Meckler *Emergency Medicine: A Comprehensive Study Guide*. Ed. McGraw-Hill. Sétima edición. Capítulo 162.
5. Kerchner G.A. (2012). Nervous System Disorders. In S.J. McPhee, M.A. Papadakis, M.W. Rabow. *Current Medical Diagnosis & Treatment 2012*. Ed. McGraw-Hill. Capítulo 24.
6. Lomen-Hoerth C., Messing R.O. (2010). Chapter 7. Nervous System Disorders. In S.J. McPhee, G.D. Hammer. *Pathophysiology of Disease*. Ed. . McGraw-Hill. Sexta edición.
7. Götz J., Ecker A., Matamales M., Ittner L. M., Liu X. Modes of A β toxicity in Alzheimer's disease. *Life Sci.* (2011) 68:3359-3375.
8. Carlsson CM, Gleason CE, Puglielli L, Asthana. Dementia Including Alzheimer's Disease. In: Halter JB, Ouslander JG, Tinetti ME, Studenski S, High KP, Asthana S, eds. *Hazzard's Geriatric Medicine and Gerontology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill; 2009. Capítulo 65

9. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2011;7:137-152.
10. Setó-Salvia N, Clarimón J. Genética en la enfermedad de Alzheimer- *Rev Neurol* 2010; 50:360-364.
11. Alves L. Correia A. S., Miguel R., Alegria P., Bugalho P. Alzheimer's Disease: A clinical Practice – oriented review. *Front. Neurol.* (2012); 3:63: 1-20
12. Goldman J. S., Hahn S. E., Catania J. W., LaRusse-Eckert S., Butson M. B., Rumbaugh M., Strecker M. N., Roberts J. S., Burke W., Mayeux R., Birt T. Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: Joint practice guidelines of the American College of medical genetics and the National Society of genetic Counselors. *Genet Med* (2011); 13: 597-608.
13. Reitz C., Brayne C., Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* (2011); 7: 137–152.
14. Brickell KL, Steinbart EJ, Rumbaugh M, Payami H, Schellenberg GD, Van Deerlin V, Yuan W, Bird TD. Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Arch Neurol.* (2006); 63:1307–1311.
15. Schellenberg G. D., Montine T. J. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* (2012); 124:305-323.
16. Bekris L, Yu C, Bird T, Tsuang D. Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr Psychiatry Neurol.* (2010); 23:213-227.

17. Lau L. F., Brodney M. A., Berg S, Bhat R. V. Alzheimer's Disease. Springer. Volumen 2. (2008) 2: 1–24
18. Sisodia S. S., Tanzi R. E.(2007) Alzheimer's Disease: Advances in Genetics, molecular and celular biology. Springer.(2007); 93-111.
19. Blom E. Genetic Studies of Alzheimer's Disease. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine (2008); 401.
20. Pozo-Serrano A., Frosch M. P., Masliah E., Hyman B. T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. Cold Spring Harb Perspect (2011);3-9.
21. Yates D., McLoughlin D. M., The molecular pathology of Alzheimer's disease. Psychiatry (2008) 7;1: 1-5.
22. Rodrigo J., Martínez A., Fernández A. P., Serrano J., Bentura M. L., Moreno E., Aparicio M., Martínez-Murillo R., Regidor J. Características neuropatológicas y moleculares de la Enfermedad de Alzheimer. Rev Esp Geriatr Gerontol (2007); 42: 103-110.
23. Duyckaerts C., Delatour B., Potier M. C., Classification and basic pathology of Alzheimer Disease. Acta Neuropathol (2009) 118: 5-36.
24. Castellani R. J., Rolston R. K., Smith Mart A. Alzheimer Disease. Dis Mon. (2010); 56: 484–546.
25. Macías E. F., González A. S., Rangel A. B., Néciga E. G. Enfermedad de Alzheimer. Medicine. (2011); 10:5129-37.

26. Chu LW. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J.* (2012); 18:228-37.
27. Kuller L. H., López O. L. Dementia and Alzheimer's disease: A new direction. The 2010 Jay L. Foster Memorial Lecture. *Alzheimers Dement.* (2011) 7: 540–550.
28. Chen J. H., Lin K. P., Chen Y. C. Risk Factors for Dementia. *J Formos Med Assoc* (2009); 108:754–764.
29. Campdelacreu J. Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer: factores de riesgo ambientales. *Neurología.* (2012): 1-9
30. Basics of alzheimer's disease. © 2012 Alzheimer's Association.
31. Revesz T., Holton J. L., Lashley T., Plant G., Frangione B., Rostagno A., Ghiso J. Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary cerebral amyloid angiopathies. *Acta Neuropathol* (2009) 118:115–130.
32. McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE, Santini VE, Lee HS, Kubitius CA, Stern RA. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2009) 68:709–35.
33. Thies W. PhD., Bleiler L. 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*(2012) 8: 131–168.
34. Hollingworth P., Harold D., Jones L., Owen M. J., Williams J. Alzheimer's disease genetics: current knowledge and future challenges. *Int J Geriatr Psychiatry* (2011); 26: 793–802.

35. Huang Y., Mucke L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell* (2012) 148(6): 1204-1222.
36. Donix M., Small G. W., Bookheimer S. Y. Family History and APOE-4 Genetic Risk in Alzheimer's Disease. *Neuropsychol Rev* (2012). 22:298-309.
37. Blennow K., De Leon M. J. M., Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* (2006); 368: 387–403.
38. Sorbi S., Forleo P., Tedde A., Cellini E., Ciantelli M., Bagnoli S., Nacmias B. Genetic risk factors in familial Alzheimer's Disease. *Mechanisms of Ageing and Development* (2001); 122: 1951–1960.
39. Lambert J. C., Amouyel P. Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: Complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology* (2007); 39:17–23
40. Nelson P. T., Head E. Schmitt F. A., Davis P. R., Netner J. H., Jicha G. A., Abner E. L., Smith C. D., Van Eldik L. J., Kryscio R. J., Scheff S. W. Alzheimer's disease is not 'brain aging: neuropathological, genetic, and epidemiological human studies. *Acta Neuropathol* (2011) 121:571–587.
41. Ikezu T. "Alzheimer's Disease". *Neuroimmune Pharmacology*. (2008). Capítulo 25.
42. Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D., Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet* (2011); 377: 1019–31.

43. Lladó A., Gaig C., Molinuevo J. L. Genética de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes”. *Medicina clínica* (2006); 126:662-670.
44. Chapman P. F., Falinska A. M., Knevet S. G., Ramsay M. F. Genes, models and Alzheimer’s Disease. *Trends in Genetics* (2007); 17: 254-261.
45. Querfurth H. W., LaFerla F. M. Mechanisms of Disease Alzheimer’s Disease. *N Engl J Med* (2010); 362: 329-44.
46. Pagani L., Eckert A. Amyloid-Beta Interaction with Mitochondria. *International Journal of Alzheimer’s Disease* (2011): 940-950.
47. O’Brien R. J., Wong P. C. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer’s Disease. *Annu Rev Neurosci.* (2011); 34: 185–204.
48. Fändrich M., Schmidt M., Grigorieff N. Recent progress in understanding Alzheimer’s β -amyloid structures. *Trends Biochem Sci.* (2011); 36:338–345.
49. Verdile G., Martin R. N. “Molecular Genetics of Alzheimer’s Disease”. *Molecular Biology of Neuropsychiatric Disorders* (2009): 23, 229-276
50. Vasto S., Candore G., Listì F., Balistreri C. R., Colonna-Romano G., Malavolta M., Lio D., Nuzzo D., Mocchegiani E., Bona D. D., Caruso C. Inflammation, genes and zinc in Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* (2008); 58: 96 – 105.
51. Barthelet G., Georgakopoulos A., Robakis N. K. Cellular mechanisms of g-secretase substrate selection, processing and toxicity. *Progress in Neurobiology* (2012); 166–175.

52. Bi X. Alzheimer Disease: Update on Basic Mechanisms. *J Am Osteopath Assoc* (2010); 110: 3-9.
53. Gallagher D. J., Mhaolaín A. N., Sperling R. A., Lawlor B. A. Alzheimer's Disease. Springer. *Neurodegenerative Disorders* (2011): 43-64.
54. Newman M., Musgrave F. I., Lardelli M. Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochimica et Biophysica Acta* (2007); 1772: 285–297.
55. Cumming J. Alzheimer's Disease: Clinical Trials and the Amyloid Hypothesis. *Alzheimer's Disease* (2011); 40: 304-306
56. Ferreira S. T., Klein W. L. The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Learning and Memory* (2011); 96: 529–543.
57. Galimberti D., Scarpini E. Progress in Alzheimer's disease. *J Neurol* (2012) 259:201–211.
58. Drouet B., Raymond P., Chambar J., Pillot T. "Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* (2000); 57: 705–715.
59. Hardy J., Selkoe D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* (2002); 297-353.
60. Lazarov O., Marr R. A. Neurogenesis and Alzheimer's disease: At the crossroads. *Experimental Neurology* (2010); 223: 267–281.

61. Maccioni R. B., Muñoz J. P., Barbeito L. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Archives of Medical Research* (2001); 32: 367–381.
62. Holtzman D. M., John M. C., Goate A. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Sci Transl Med.* (2011); 3: 1-15.
63. Bird T. D. Genetic Factors in Alzheimer Disease and Dementia. *Vogel and Motulsky's Human Genetics* (2010); 20: 63-72.
64. Wang X. P., Ding H. L. Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond. *Neurosci Bull* (2008); 24: 105-109.
65. "The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff". www.hgmd.org.
66. Peter H., St George-Hyslop. Molecular Genetics of Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* (2000); 47: 183–199.
67. Ertekin-Taner N. Genetics of Alzheimer's Disease: A Centennial Review. *Neurol Clin* (2007); 25: 611–667.
68. Guerreiro R. J., Gustafson D. R., Hardy J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiology of Aging* (2012); 33: 437–456.
69. Suh Y. H., Checler F. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and α -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacological Reviews* (2002); 54: 469-525.

70. Sorbi S., Forleo P., Tedde A., Cellini E., Ciantelli M., Bagnoli S., Nacmias B. Genetic risk factors in familial Alzheimer's Disease. *Mechanisms of Ageing and De_velopment* (2001); 122: 1951–1960.
71. Oakley H., Cole SL., Logan., Maus E., Shoo P., Craft J., Guillozet-Bongaarst A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry., Vassar. International β -amyloid aggregates, neurodegeneration, and neurons loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* (2006); 26: 10129-10140.
72. Hampel H., Prvulovic D, Teipel S., Jessen F., Luckhaus C., Frölich L., Riepe M. W., Dodel R., Leyhe T., Bertram L., Hoffmann W., Faltraco F. The future of Alzheimer's disease: The next 10 years. *Progress in Neurobiology* (2011):718–728.
73. Llado A., Molinuevo J. L. Enfermedad de Alzheimer Familiar. *Gastroenterología y Hepatología Continuada* (2006); 5: 191–193.
74. BA. Skeehan K., Ba. Heaney C., MD. Cook-Deegan R. Impact of Gene Patents and Licensing Practices on Access to Genetic Testing for Alzheimer's Disease. *Genet Med.* 2010 April ; 12(4 Suppl): S71–S82.
75. "Alzheimer Disease and Frontotemporal dementia Mutation Data Base". <http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/>.
76. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* (1995); 375: 754–760.
77. National Center for Biotechnology information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22266/>

78. e!Ensembl. <http://www.ensembl.org/index.html>
79. Fraser P. E., Yang D. S., Yu G., Lévesque L., Nishimura M., Arawaka S., Serpell L. C., Rogaeva E., Hyslop P. St G., Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta* (2000); 1502: 1-15.
80. Supnet C., Bezprozvanny I. Presenilins as endoplasmic reticulum calcium leak channels and Alzheimer's disease pathogenesis. *Sci China Life Sci* August (2011); 54.
81. Vetrivel K. S., Zhang Y., Xu H., Thinakaran G. Pathological and physiological functions of presenilins. *Molecular Neurodegeneration* (2006); 1.
82. Wakabayashi T., Iwatsubo T., De Strooper B. The Biology of the Presenilin Complexes. Springer. *Alzheimer's Disease* (2007); 35-58.
83. Grigorenko A. P., Rogaev E. I. Molecular Basis of Alzheimer's Disease. *Molecular Biology*, (2007); 41: 294-307.
84. Sisodia S. S., Kim S. H., Thinakaran G. Function and Dysfunction of the Presenilins. *Am. J. Hum. Genet.* (1999); 65:7-12.
85. Kim T. W., Tanzi R. E. Presenilins and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology* (1997); 5.

86. Laudon H., Winblad B., Näslund J. The Alzheimer's disease-associated γ -secretase complex: Functional domains in the presenilin 1 protein. *Physiology & Behavior* (2007); 29: 115–120.
87. Hass M. R., Sato C., Kopan R., Zhao G. Presenilin: RIP and beyond. *Seminars in Cell & Developmental Biology* (2009); 20: 201–210.
88. Wolfe M. S. APP, Notch, and presenilin: molecular pieces in the puzzle of Alzheimer's disease. *International Immunopharmacology* (2002); 2: 1919–1929.
89. Woo H. N., Park J. S., Gwon A. R., Arumugam T. V., Jo D. G. Alzheimer's disease and Notch signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2009): 1093–1097.
90. Xia X., Qian S., Sorianos S., Wu Y., Fletcher A. M., Wang X. J., Koo E. H., Wu X., Zheng H. Loss of presenilin 1 is associated with enhanced β -catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2001); 98: 10863–10868.
91. Czech C., Tremp G., Pradier L. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology* (2000); 60: 363-384.
92. Georgakopoulos A., Marambaud P., Efthimiopoulos S., Shioi J., Cui W., Li H. C., Schütte M., Gordon R., Holstein G. R., Martinelli G., Mehta P., Friedrich V. L., Robakis K., Nikolaos. Presenilin-1 Forms Complexes with the Cadherin/Catenin Cell–Cell Adhesion System and Is Recruited to Intercellular and Synaptic Contacts. *Molecular Cell* (1999); 4: 893-902.

93. Parks A. L., Curtis D. Presenilin diversifies its portfolio. *Trends in Genetics* (2007); 23: 140-150.
94. St George-Hyslop., Frase P. E. Assembly of the presenilin γ - ϵ -secretase complex. *J. Neurochem.* (2012); 120: 84–88.
95. Kelleher R. J., Shen J. *Genetics*. Gamma-secretase and human disease. *Science*. (2010); 6007:1055-1056.
96. Cole S. L., Vassar R. The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration* (2007); 2: 10-22.
97. Saura C. A. Presenilin/ γ -secretase and inflammation. *Frontiers in Aging Neuroscience* (2010); 2: 1-16.
98. Wolfe M. S. γ -Secretase and Alzheimer's disease. Springer. *Alzheimer's disease* (2007); 35-58.
99. De Strooper B., Iwatsubo T., Wolfe M. S. Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *J Biol Chem.* (2006); 281: 26569-26577.
100. Pastor P., Goate A. M. Molecular Genetics of Alzheimer's Disease. *Current Psychiatry Reports* (2004); 6:125–133.
101. Brindle N. St. George-Hyslop P. The Genetics of Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Disease. Methods in Molecular Medicine* (2011).

102. Ho A., Shen J. Presenilins in synaptic function and disease. *Trends in molecular medicine* (2011); 17: 617-624.
103. Goedert M., Ghetti B., Spillantini M. G. Frontotemporal Dementia: Implications for Understanding Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012); 4: 1-15.
104. Rabinovici G. D., Miller B. L. Frontotemporal Lobar Degeneration: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Management. *CNS Drugs*. (2010) 1; 24: 375–398.
105. Sieben A., Langenhove T. V., Engelborghs S., Martin JJ., Boon P., Cras P., De Deyn PP., Santens P., Van Broeckhoven C., Cruts M. The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* (2012); 124: 353-372.
106. Kishner H. S. Frontotemporal Dementia and Primary Progressive Aphasia: An Update. *Curr Neurol Neurosci Rep* (2010); 10:504–511.
107. Haugarvoll K., Wszolek Z. K., Hutton M. The Genetics of Frontotemporal Dementia. *Neurol Clin* (2007); 25: 697–715.
108. Pickering-Brown S. M. Progranulin and frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* (2007); 114: 39–47.
109. Mackenzie I. R. A., Rademakers R. The molecular genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: recent developments. *Neurogenetics* (2007); 8:237–248.

110. Roberson E. D. Frontotemporal Dementia. *Current Neurology and Neuroscience Reports* (2006); 6: 481–489.
111. Sieben A., Langenhove T. V., Engelborghs S., Martin JJ., Boon P., Cras P., De Deyn PP., Santens P., Van Broeckhoven C., Cruts M. The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* (2012); 124: 353-372.
112. Ferrari R., Hardy J., Momeni P. Frontotemporal Dementia: From mendelian genetics towards genome wide association studies. *J Mol Neurosci.* (2011); 45: 500-515.
113. Galimberti D., Scarpini E. Genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Frontiers in Neurology* (2012); 3: 201-207.
114. Rademakers R., Hutton M. The Genetics of Frontotemporal Lobar Degeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports* (2007); 7: 434–442.
115. Nicholson A. M., Gass J., Petrucelli L., Rademakers R. Progranulin axis and recent developments in frontotemporal lobar degeneration. *Alzheimer's Research & Therapy* (2012); 4: 1-4.
116. "Resources for Molecular Cytogenetics". <http://www.biologia.uniba.it>
117. Smout M. J., Mulvenna J. P., Jones M. K., Loukas A. Expression, refolding and purification of Ov-GRN-1, a granulin-like growth factor from the carcinogenic liver fluke, that causes proliferation of mammalian host cells. *Protein Expression and Purification* (2011); 79: 263–270.

118. Eiksen J. L., Mackenzie I. R. A. Progranulin: normal function and role in Neurodegeneration. International Society for Neurochemistry, J. Neurochem. (2008); 104: 287–297.
119. Sun L., Eriksen J. L. Recent Insights into the Involvement of Progranulin in Frontotemporal Dementia. Current Neuropharmacology, (2011); 9: 632-642.
120. Ahmend Z., Mackenzie I. R. A., Hutton M. I., Dickson D. W. Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation. Journal of Neuroinflammation (2007); 4: 1-7.
121. Toh H., Chitramuthu B. P., Bennett H. P. J., Bateman A. Structure, function and mechanism of progranulin; the brain and beyond. J Mol Neurosci. (2011); 45: 538-548
122. Rademakers R., Rovelet-Lecrux A. Recent insights into the molecular genetics of dementia. Trends Neurosci. (2009); 32: 451–461.
123. Ward M. E., Miller B. L. Potential Mechanisms of Progranulin-deficient FTLD. J Mol Neurosci. (2011); 45: 574-582.
124. De Muynick L., Van Damme P. Cellular effects of progranulin in health and disease. J Mol Neurosci. (2011); 45: 549-560.
125. Cruts M, van Duijn CM, Bachhovens H, Van den Broeck M, Wehnert A, Serneels S, Sherrington R, Hutton M, Hardy J, George-Hyslop PH, Hofman A, Van Broeckhoven. Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer's. Hum Mol Genet (1998); 1:43-51.

126. Cruts M., Broeckhoven C. V. Loss of progranulin function in frontotemporal lobar degeneration. *Trends in genetics* (2008); 24: 186-194.
127. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. (2006); 24:916-919.
128. Yescas P, Vazquez-Huertas A, Villarreal-molina T. Rasmussen A., Tusié-Luna M. T., López M, Canizales-Quinteros S, Alonso M E. Founder effect for the Ala431Glu mutation of the presenilin 1 gene causing early-onset Alzheimer's disease in mexican families. *Neurogenetics* (2006); 7: 195-200.
129. "Polyphen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs". <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
130. RCSB Protein Data Bank – RCSB PDB <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
131. Gass J, Cannon A, Mackenzie IR, Boeve B, Baker M, Adamson J, Crook R, Melquist S, Kuntz K, Petersen R, Josephs K, Brown SP, Graff-Radford N, Uitti R, Dickson D, Wzsolek Z, Gonzalez J, Beach TG, Bigio E, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, White CL 3rd, Woodruff B, Caselli R, Hsiung GY, Feldman H, Knopman D, Hutton M, Rademakers R. Mutations in progranulin are a major cause of ubiquitin-positive frontotemporal lobar degeneration. *Human Molecular Genetics* (2006); 15: 2988-3001.

132. Beck J, Rohrer JD, Campbell T, Isaacs A, Morrison KE, Goodall EF, Warrington EK, Stevens J, Revesz T, Holton J, Al-Sarraj S, King A, Scahill R, Warren JD, Fox NC, Rossor MN, Collinge J, Mead S. A distinct clinical, neuropsychological and radiological phenotype is associated with progranulin gene mutations in a large UK series. *Brain* (2008); 131: 706-720.
133. Rohrer JD, Warren JD, Omar R, Mead S, Beck J, Revesz T, Holton J, Stevens JM, Al-Sarraj S, Pickering-Brown SM, Hardy J, Fox NC, Collinge J, Warrington EK, Rossor MN. Parietal lobe deficits in frontotemporal lobar degeneration caused by a mutation in the progranulin gene. *Archives of Neurology* (2008); 65: 506-513.
134. Rohrer JD, Guerreiro R, Vandrovcova J, Uphill J, Reiman D, Beck J, Isaacs AM, Authier A, Ferrari R, Fox NC, Mackenzie IR, Warren JD, de Silva R, Holton J, Revesz T, Hardy J, Mead S, Rossor MN.. The heritability and genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* (2009); 73: 1451-1456.
135. Yu CE, Bird TD, Bekris LM, Montine TJ, Leverenz JB, Steinbart E, Galloway NM, Feldman H, Woltjer R, Miller CA, Wood EM, Grossman M, McCluskey L, Clark CM, Neumann M, Danek A, Galasko DR, Arnold SE, Chen-Plotkin A, Karydas A, Miller BL, Trojanowski JQ, Lee VM, Schellenberg GD, Van Deerlin VM. The spectrum of mutations in progranulin: a collaborative study screening 545 cases of neurodegeneration. *Archives of Neurology* (2010); 67: 161-170.
136. Rohrer JD, Ridgway GR, Modat M, Ourselin S, Mead S, Fox NC, Rossor MN, Warren JD. Distinct profiles of brain atrophy in frontotemporal lobar degeneration caused by progranulin and tau mutations. *Neuroimage* (2010); 53: 1070-1076.

IX. Apéndice.

A. Reactivos.

- ▣ Agarrosa Ultrapura (Bio-rad®).
- ▣ Bromuro de etidio: Promega® (10mg/mL)
- ▣ Cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción: 49:2.
- ▣ Kit de purificación de productos de PCR (Promega®).
- ▣ Kit de secuenciación: *Big-dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing* (AB).
- ▣ Marcador de peso molecular: GeneRuler™ Low Range DNA Ladder y GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido de la región promotora del gen *GRN*:
5'-GCCAGCTCAGTAGCTCACAT-3'
5'-TATCAGAACCCCAAGGAGT-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 1-3 del gen *GRN*:
5'- GGGGCTAGGGTACTGAGTG-3'
5'- AGCAGGGCTGTTGCTTAGTA-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 4-6 del gen *GRN*:
5'- GCCTTAGTGTCACCCTCAA-3'
5'- CACTAGGGGGTAGCATGAAC-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 7-9 del gen *GRN*:
5'- TGATGCAGGGTTCATGCTA-3'
5'- GAGCTGGGTATCACCTATGG-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 10-11 del gen *GRN*:
5'- TACCCAGCTCTGACAGATTC-3'
5'- AGAGGGTTGGACGAGGT-3'
- ▣ Oligonucleótido sentido y antisentido del exón 11-12 del gen *GRN*:
5'- CCTGGATAGGGGAGCTAAG-3'
5'- AATGTGATACAGCCGATGTG-3'
- ▣ SDS 10%: Dodecil sulfato de sodio (10g/1L).
- ▣ TBE10%: Tris base (108g), EDTA (9.3g), ácido bórico (55g), agua (Cbp 1L).

B. Equipos y materiales.

- ▣ Agitador: Daigger Vortex Gene 2
- ▣ Balanza analítica: Denver Instrument Company AA-200.
- ▣ Cámara de electroforesis Labnet E1020-20
- ▣ Centrífuga: Eppendorf 5415 D, Eppendorf 5810 R.
- ▣ Concentrador al vacío: Eppendorf 5301
- ▣ Fotodocumentador Bio-Rad
- ▣ Fuente de poder: Bio-Rad Power Pac 3000.
- ▣ Micropipetas Gilson Pipetman.
- ▣ Secuenciador ABI PRISM 3130.
- ▣ Termociclador Applied Biosystems 2720.
- ▣ Transiluminador LabNet TM-26.

C. Índice de Tablas.

Tabla 1. Demencias Hereditarias.	11
Tabla 2. Clasificación de la EA de acuerdo al Colegio Americano de Genética Médica.....	12
Tabla 3. Genes involucrados en el desarrollo de la EA de inicio temprano de tipo familiar.....	24
Tabla 4. Mutaciones puntuales en el gen <i>PSEN1</i>	26
Tabla 5. Mutaciones puntuales en el gen <i>GRN</i>	41
Tabla 6. Reactivos utilizados en la PCR del gen <i>PSEN1</i>	52
Tabla 7. Reactivos Utilizados en la PCR del gen <i>GRN</i>	53
Tabla 8. Condiciones generales de la PCR, para los exones del gen <i>PSEN1</i> .Se varía la temperatura de alineamiento de acuerdo a la Tm de cada par de oligonucleótidos.....	53
Tabla 9. Condiciones de la PCR para los exones del gen <i>GRN</i>	54
Tabla 10. Reactivos empleados en la reacción de secuenciación.	55
Tabla 11. Condiciones de la reacción de secuenciación.	56
Tabla 12. Mutaciones identificadas en el gen <i>PSEN1</i>	66
Tabla 13. Lugar de origen de los pacientes que presentan la mutación A431E en el exón 12 del gen <i>PSEN1</i>	66

D. Índice de figuras.

Figura 1. Procesamiento a través de las dos vías metabólicas de la PPA.....	20
Figura 2. Hipótesis de la cascada amiloide que explica el mecanismo por el cual se lleva al desarrollo de la demencia.	21
Figura 3. Formación de las marañas de neurofibrillas.....	23
Figura 4. En la parte superior se muestra la localización del gen <i>PSEN1</i> en la región cromosómica 14q24.3. En la parte inferior se muestra una imagen modular del gen <i>PSEN1</i> , donde se observan del exón 12 al 3 de izquierda a derecha.....	27
Figura 5. Estructura de la proteína Presenilina 1.	28
Figura 6. Se muestra el procesamiento de la proteína Notch hasta conducir a la transducción de señales.....	32
Figura 7. Complejo γ -secretasa.....	34
Figura 8. Formación del complejo catalítico γ -secretasa.....	35
Figura 9. Localización del gen <i>GRN</i> en la región cromosómica 17q21.32.	44
Figura 10. En la parte superior se representa la organización modular del gen <i>GRN</i> . En la parte inferior se representa de manera esquemática y tridimensional la proteína que codifica el gen <i>GRN</i> (Progranulina).....	44
Figura 11. Metodología General.....	48
Figura 12. Género y edad de los pacientes con probable diagnóstico de demencia tipo Alzheimer.....	58
Figura 13. Género y edad de los pacientes con probable diagnóstico de demencia frontotemporal.	59
Figura 14. Distribución del total de los 60 pacientes estudiados.	59
Figura 15. Integridad del DNA genómico.	60
Figura 16. En la parte superior se muestra la estructura modular del gen <i>PSEN1</i> . En la parte inferior aparece la resolución de los Productos de PCR en un gel de agarosa al 2% flanqueados por un marcador de peso molecular (MP) <i>GeneRuler™ Low Range DNA Ladder</i> de la marca (<i>Fermentas®</i>) donde se muestra del exón 12 al 4 del gen <i>PSEN1</i> , y en la parte superior del producto su correspondiente número de pares de base (pb).	61

Figura 17. En la parte superior se presenta la imagen modular del gen *GRN*. En la parte inferior aparece la resolución de los Productos de PCR flanqueados por un MP (*GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder*) mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El carril 1 muestra el producto amplificado que corresponde a la región promotora, mientras que el carril 2 al 6 se muestran los productos de PCR de los exones 1-3, 4-6, 7-9, 10-11, 11-12 de *GRN* respectivamente, y en la parte superior del producto su correspondiente número de pares de bases..... 62

Figura 18. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 12 de *PSEN1*. La flecha señala el cambio que ocasiona la mutación A431E..... 63

Figura 19. Secuencia parcial normal y mutada del exón 12, donde se ilustra el cambio de nucleótido y aminoácido. 64

Figura 20. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 11 de *PSEN1*. La flecha señala el cambio que ocasiona la mutación F388L. 65

Figura 21. Secuencia parcial normal y mutada del exón 12, de *PSEN1* donde se ilustra el cambio de nucleótido y aminoácido. 65

Figura 22. Electroferograma de la secuencia parcial del exón 2 de *GRN*. La flecha señala el cambio que ocasiona la mutación p.Cys31fs..... 67

Figura 23. Secuencia parcial normal y mutada del exón 2, de *GRN* donde se ilustra la inserción de los cuatro nucleótidos, como cambia el marco de lectura y el aminoácido..... 68

Figura 24. Se muestra la ubicación espacial de la mutación A431E (Protein data base) y en la parte inferior el resultado obtenido a través del programa *PolyPhen v2.0* 70

Figura 25. Se muestra la ubicación espacial de la mutación F388L (Protein data base) y en la parte inferior el resultado obtenido a través del programa *PolyPhen v2.0*. 71