



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE EL DAÑO COGNOSCITIVO Y LA
EXPRESIÓN DE MARCADORES EXTRA-CEREBRALES PARA EL DIAGNÓSTICO
TEMPRANO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

KARLA CARMINA ROJAS SAAVEDRA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE EL DAÑO COGNOSCITIVO Y LA
EXPRESIÓN DE MARCADORES EXTRA-CEREBRALES PARA EL DIAGNÓSTICO
TEMPRANO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

KARLA CARMINA ROJAS SAAVEDRA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2014.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de junio de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ROJAS SAAVEDRA KARLA CARMINA** con número de cuenta **506021415** con la tesis titulada **“ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE EL DAÑO COGNOSCITIVO Y LA EXPRESIÓN DE MARCADORES EXTRA-CEREBRALES PARA EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**, realizada bajo la dirección del **DR. MIGUEL ÁNGEL JORGE GUEVARA FONSECA**:

Presidente: DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Secretario: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO
Suplente: DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO
Suplente: DR. MOISÉS RUBIO OSORNIO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de junio de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por ser un excelente guía en mi formación académica.

Gracias a CONACyT (registro becario 203415) por el apoyo económico brindado, y la oportunidad de ampliar mi formación en diferentes escenarios.

Al Dr. Jorge Guevara Fonseca por el conocimiento transmitido, por ser un gran apoyo y guía a lo largo de mi formación.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo por todo su apoyo y por ser un gran ejemplo.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por todos sus conocimientos transmitidos.

DEDICATORIA

A mis padres por ser el mejor ejemplo de lucha y responsabilidad, por todo apoyo, su ayuda, los amo.

A mis hermanos Verónica, Héctor, Abraham, Dul, Horacio, Pily, Lalo, porque siempre estuvieron para apoyarme, gracias.

A Sofi, Jaciel, Cirse y Zazil porque siempre me inspiran y me transmiten toda su alegría, los amo.

A mis suegros porque siempre han estado conmigo. Gracias en verdad por todo su apoyo y por ser unos segundos padres para mi.

Al amor de mi vida Pepe, por estar a mi lado siempre, por el enorme apoyo, compañía, ejemplo, por toda tu ayuda, motivación y ser parte de mi vida, te amo.

A mi hija María José porque eres mi mayor motivación, te amo mi Moshi hermosa.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	19
Objetivo general.....	19
Metas.....	19
METODOLOGÍA.....	20
Muestras.....	20
Criterios de inclusión y exclusión.....	20
Consideraciones éticas.....	21
Evaluación Neuropsicológica.....	21
Toma de muestras.....	21
Análisis de marcadores.....	22
Análisis estadístico.....	22
Población de referencia.....	23
RESULTADOS.....	29
Población de referencia.....	29
Población mexicana.....	34
Evaluación Neuropsicológica.....	34
Cuantificación de nitritos.....	38
Cuantificación de citocinas.....	39
Correlación de Spearman.....	41
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	51
PERSPECTIVAS.....	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXO I. Artículo: Correspondence amongst the PENO test battery cognitive results and hippocampal lesions in Alzheimer’s disease.....	69
ANEXO II. Consentimiento informado.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Deterioro cognitivo evaluado por funciones.....	29
Figura 2. Depósitos de amiloide- β	32
Figura 3. Tau hiperfosforilada.....	32
Figura 4. Imagen confocal con doble marca de una típica Placa Neurítica.....	32
Figura 5. Marañas neurofibrilares.....	32
Figura 6. Neuritas Distróficas.....	32
Figura 7. Estructuras Meganeuríticas.....	32
Figura 8. Histogramas de frecuencia.....	35
Figura 9. Tabla de frecuencia.....	36
Figura 10. Gráfica general de los resultados de las evaluaciones neuropsicológicas.....	37
Figura 11. Concentración de nitritos por grupos.....	39
Figura 12. Concentración de citocinas por grupo.....	40
Figura 13. Correlación de Spearman entre la evaluación neuropsicológica y los diferentes marcadores.....	42

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la más común de las demencias y enfermedades neurodegenerativas. Sus síntomas clínicos son progresivos, involucran funciones cerebrales como memoria, lenguaje, atención, área viso-constructiva, componente emocional, entre otras. Estas alteraciones pueden evaluarse con pruebas neuropsicológicas. Existe un avance tecnológico importante para tratar de detectar la enfermedad en vida, aunque se necesita hacer más investigación, para ello, es importante el estudio multidisciplinario. Actualmente muchos de los esfuerzos se centran en la búsqueda de biomarcadores, que correlacionen con los síntomas clínicos de los pacientes, para un diagnóstico temprano. En este trabajo, proponemos un método de diagnóstico temprano por medio de la correlación de evaluación neuropsicológica y los biomarcadores estudiados. Proponemos que la batería de pruebas neuropsicológicas es sensible a la detección de daño cognitivo en pacientes con demencia, y que existe diferencia entre grupos, en la expresión de los biomarcadores sistémicos estudiados.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia and age-dependent neurodegenerative disorder. It represents one of the major public health problems in our modern age and epidemiological investigations. The symptoms in the clinic are the progressive loss of superior capacities like memory, language, attention, visio-constructive area, emotional in the others. These alterations can be evaluated by neuropsychological test. Even though there was significant technological advance, improved *ante mortem* AD diagnostic methods are still needed. In addition, it is necessary to translate neurobiological knowledge and biomarker research into clinical and neurophysiological practice. In this perspective, there is a significant effort to discover novel candidate biomarkers and a clinical or neuropsychological profile that together with those well-established will be able to improve the accuracy of diagnosis. In this way, we propose an early method for diagnosis for Alzheimer's disease patients by the correlation of the neuropsychological evaluation and the inflammation biomarkers studied. We propose that the neuropsychological battery is sensible to cognitive impairment detection in dementia, and there are differences between groups in the expression of systemic biomarkers.

INTRODUCCION

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa de carácter multifactorial asociado a factores de riesgo, como son el envejecimiento, traumas cráneo-encefálicos y genéticos (Annaert Y De Strooper, 2002; Hattori, 2012). Es el tipo más común de demencia y de acuerdo a su gravedad, se clasifica en leve, moderado o severo. Clínicamente se caracteriza por un deterioro progresivo de las Funciones Cerebrales Superiores (FCS), las cuales son evaluadas por pruebas neuropsicológicas. Esta deficiencia cognoscitiva de los pacientes se debe a una alteración de las funciones que dependen de los circuitos cerebrales asociativos corticales. Las FCS afectadas son principalmente memoria, lenguaje, funciones o habilidades viso-constructivas y atención, aunque también se ve afectado el estado emocional. Estos aspectos se pueden evaluar por medio de pruebas neuropsicológicas, que nos ayudan a acercarnos a un diagnóstico de demencia tipo Alzheimer (DA). Al iniciar la evaluación neuropsicológica para un diagnóstico de demencia, habitualmente se utilizan pruebas breves, de administración rápida, que permitan al examinador situarse respecto del funcionamiento cognoscitivo del paciente. Una de las pruebas más utilizada es la prueba neuropsicológica del *Examen Mínimo del Estado Mental de Folstein o "Minimental"* (MMSE) (Folstein *et al.*, 1975), prueba cognoscitiva abreviada de mayor difusión internacional, principalmente evalúa orientación, memoria, atención, habilidades básicas del lenguaje, cálculo y constructivas, aunque se propone que no es suficiente para dar un diagnóstico de

DA, por lo que es recomendable complementar la evaluación neuropsicológica con otras pruebas con mayor sensibilidad y específicas para cada dominio cognoscitivo. La evaluación deberá comprender funciones cognoscitivas como memoria verbal episódica inmediata y diferida, reconocimiento verbal inmediato y diferido, memoria visual inmediata y diferida, memoria semántica, memoria de trabajo, lenguaje, pensamiento abstracto, atención sostenida, atención selectiva, atención ejecutiva, fluencia verbal fonológica, fluencia verbal semántica, visuoconstrucción y visuespecialidad (Wechsler, 1987).

Las pruebas neuropsicológicas utilizadas para evaluar dichas funciones cognoscitivas incluyen el *Stroop Test* (Stroop, 1935). Esta prueba nos ayuda a evaluar el lenguaje del paciente, la ejecución, selección, atención y organización. El *Test del Reloj* (Kennedy, 1981), que inicialmente fue ideada para evaluar visuoespacialidad y praxia constructiva, también permite evaluar otros dominios cognoscitivos como la planeación. La memoria se define como la capacidad de retener información del pasado, con base en la experiencia vivida. Se considera que en los pacientes con EA, el deterioro en la memoria es uno de los primeros síntomas (Hodges, 1992). Se establece que la EA es una demencia amnésica, ya que el defecto amnésico (dificultades para aprender e incorporar materiales nuevos), temprano e intenso, constituye el núcleo central de la enfermedad. Esto puede evaluarse por medio del *Cuestionario de Memoria Subjetiva de Bennett* (1980). En estos pacientes, también se altera la capacidad de evocación libre, al mismo tiempo que aumentan los reconocimientos falsos (Tounsi *et al.*, 1999) y se

ve alterada la memoria verbal, tanto a corto como a largo plazo, función que se puede evaluar por medio del *Test de Aprendizaje Verbal de California* (Delis, 1987). La *Escala de Memoria de Wechsler* (1981), nos da un índice general de memoria y evalúa áreas de información personal, orientación en tiempo y espacio, control mental, memoria lógica, repetición de dígitos (directo e inverso), y aprendizaje de pares asociados de palabras. Para evaluar la memoria visual se aplica el *Test de la Copia de la Figura Compleja de Rey-Osterrieth* (Osterrieth, 1944). Con el fin de enfocarnos en las actividades de la vida diaria del paciente, se cuenta con el *Test de Habilidades de la vida cotidiana* (Lawton y Brody, 1969), que plantea situaciones de la vida diaria. Analiza la capacidad necesaria para un funcionamiento adecuado en la vida cotidiana, más que el rendimiento en una situación experimental. La atención y orientación en tiempo, espacio y persona, es el conocimiento que tiene el individuo de su entorno. Es un concepto heterogéneo que relaciona varias capacidades cognoscitivas, como la atención, vigilancia, memoria reciente, conocimiento autobiográfico y proyección en el futuro. La persona que padece EA empieza a presentar desorientación en el tiempo, y más tarde en el espacio, sobre todo en lugares no habituales. En cuanto al área de lenguaje, es importante evaluar la función denominativa con el *Test de Denominación de Boston* (Lezak, 1995), y la fluencia verbal a través del *Test de Fluidez Verbal* (Bennet-Levy y Powell, 1980). Finalmente se valora también la presencia de alteraciones emocionales a través del *Inventario de Depresión de Beck* (Beck et al., 1961). Con base en una completa evaluación neuropsicológica, podemos obtener una estimación del grado de demencia. La Escala Clínica de

Demencia para Alzheimer –CDR (Clinical Dementia Rating) establece 5 estadios posibles, basándose en el rendimiento de seis áreas principales del funcionamiento cognoscitivo y conductual (memoria, orientación, juicio y resolución de problemas, asuntos cotidianos, hogar y pasatiempos). Los estadios son: 0=Normal, 0.5=Demencia Cuestionable, 1=Demencia Leve, 2=Demencia Moderada y 3=Demencia Severa.

El diagnóstico real de la EA se confirma *post mortem*, así, histopatológicamente esta enfermedad se caracteriza por la presencia de placas neuríticas (PNs), marañas neurofibrilares (MNFs) y neuritas distróficas (NDs) en el cerebro. Existen dos tipos de EA, uno es de tipo familiar y el otro de tipo esporádico. El tipo familiar afecta del 5-10% de la población con EA. Los genes que se encuentran mutados en esta variante son el precursor del amiloide- β (APP β), y las presenilinas 1 y 2. El esporádico, se considera multifactorial. Afecta del 90-95% de la población con EA. En esta variante no se conoce la causa de la enfermedad. Asociados a la presencia de las PN y MNF, existen diferentes eventos fisiológicos que participan en la EA. Existen argumentos a favor de que la inflamación juega un papel muy importante (Kitazawa *et al.*, 2004). Se señalan, entre otros: 1) En las placas neuríticas se encuentra microglía activada, factores del complemento e interleucinas que pueden interactuar con el A β . 2) Las personas que toman anti-inflamatorios crónicamente tienen menos prevalencia de EA que la población general. Se propone que los daños extracelulares hacia las neuronas pueden ayudar a la producción de citocinas pro-inflamatorias por la glía

(Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2013), así la disfunción producida a nivel celular puede causar degeneración neurofibrilar en la EA (Saez *et al.*, 2004). Las citocinas son una familia de proteínas que incluye interleucinas (ILs) proinflamatorias, TNF α y β (Factor de Necrosis Tumoral α y β). Su producción se incrementa con eventos de inflamación y su función consiste en regular la intensidad y duración de la respuesta inmune. Son producidas por la microglia y los astrocitos en el SNC. Las quimiocinas son citocinas pro-inflamatorias que participan en el reclutamiento celular, atrayendo leucocitos a los sitios de inflamación, como IL-8. Existe controversia en cuanto a la expresión de citocinas y quimiocinas en cerebros con EA (Moore y O'Banion, 2002; Wilson *et al.*, 2002). Se ha sugerido que IL-1 promueve la síntesis y procesamiento de APP (Proteína Precursora del Amiloide- β) (Zhao *et al.*, 2011), aumenta la actividad de acetilcolinesterasa, la activación de la microglia y astrocitos (Mrak y Griffin, 2001). TNF α está involucrada en eventos de supervivencia o muerte neuronal, participa en el incremento y producción del A β (Blasko *et al.*, 1999). Se observa una sobreexpresión de IL-1 tanto en la iniciación como en la progresión de los cambios característicos neuropatológicos de la EA (Ghosh *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013). Esta sobreexpresión de IL-1 fue descrita por Griffin y colaboradores (2013), y ahora se propone que en el estado avanzado de la enfermedad, patológicamente las placas neuríticas disminuyen en número y en su asociación a neuronas, sugiriendo que IL-1 tiene un papel importante en el daño y muerte neuronal (Rubio-Perez y Morillas-Ruiz, 2012). Algunas propuestas de los mecanismos de neurotoxicidad de IL-1 en la EA

sugieren que tiene efecto neurotrófico, promoviendo la síntesis (Forloni *et al.*, 1992) y el procesamiento (Buxbaum *et al.*, 1992) de APP. Existe disminución en la producción de citocinas como IFN- γ (Interferon γ) que puede deberse a una pérdida parcial de la afinidad del receptor de IL-2 (Interleucina-2) en la célula NK (Natural Killers), como consecuencia de la disminución en la concentración de IL-12 durante el proceso de envejecimiento (Krishnaraj, 1997). Específicamente en la EA, la microglia juega un papel muy importante en la respuesta celular para formar las lesiones patológicas, como son la producción de A β y la asociación a las placas neuríticas (McGeer y McGeer, 2013). La exposición de la microglia al A β causa la activación e incremento de la expresión de células del MHC II (Complejo Mayor de Histocompatibilidad II), y así se favorece el incremento en la secreción de las citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF α , así como algunas quimiocinas como IL-8 (Rogers y Lue, 2001). Las neuronas son capaces de producir IL-1 (Friedman, 2001), IL-6 (Li *et al.*, 2000b) y TNF α (Gabbita *et al.*, 2012). Estas citocinas secretadas por los astrocitos, microglia o neuronas, pueden entonces inducir la síntesis de ciertas proteínas incluyendo el APP (Blasko *et al.*, 2000). Un fragmento tóxico en el péptido 25-35, involucrándose en la formación de PNs. Así, el péptido A β por si mismo puede inducir la expresión de IL-1 β , TNF- α , e IL-6 en astrocitos y microglia en cultivo celular (Chong, 1997; Veerhuis *et al.*, 1999), y que puede promover el desarrollo de la neurodegeneración (Takeuchi *et al.*, 2006). Interleucina-6 se ha encontrado en estados tempranos de la formación de la PN en pacientes con EA (Mehlhorn *et al.*, 2000; Luterman *et al.*, 2000). TNF α

en asociación a iNOS (Óxido Nítrico Sintetasa inducible) tienen un papel mediador en la producción del A β (Medeiros *et al.*, 2007). Así, se sabe que el estrés oxidante también participa en la EA (Liu *et al.*, 2013). Existe decremento en los niveles de NO (Óxido Nítrico), lo cual correlaciona con el deterioro cognoscitivo de los pacientes con EA (Corzo *et al.*, 2007). Se propone que IL-1 β induce iNOS en neuronas hipocampales (Serou *et al.*, 1999), y a su vez, la producción de NO, el cual participa en el daño y muerte neuronal (Takeuchi *et al.*, 1998; Phul *et al.*, 2000).

El Óxido Nítrico (NO) es un gas simple que se ha visto implicado en la producción de varios procesos fisiológicos a nivel de todo el organismo. A nivel del SNC, el NO es una molécula de señalización producida por neuronas y células endoteliales en el cerebro. El NO se sintetiza a partir de L-arginina y oxígeno por la NOS (Óxido Nítrico Sintasa), de la cual existen tres isoformas: nNos (neuronal), eNOS (endotelial) e iNOS (inducible). La eNOS actúa como vaso relajante en la vasculatura y como neurotransmisor cuando es producido por las neuronas bajo condiciones patológicas de la EA (Malinski, 2007). Junto con la fagocitosis, el A β puede inducir la expresión de NOS en la microglia, dando como resultado la pérdida selectiva de poblaciones neuronales (Weldon *et al.*, 1998). Los AGEs (Productos finales de glicación avanzada) inducen la expresión de varias citocinas pro-inflamatorias y la iNOS, provocando un estado de estrés oxidante. Existe colocalización en la corteza temporal de pacientes con EA, de AGEs e iNOS, así

como de AGEs y placas neuríticas a comparación de los controles. Así se propone que la activación de la microglia y los astrocitos por los AGEs provoca estrés oxidante y la liberación de citocinas pro-inflamatorias, participando en la progresión de la EA y en las lesiones características de esta enfermedad (Wong *et al.*, 2001). La muerte celular y los cambios morfológicos en las neuronas son parcialmente reducidos cuando se inhibe al NO por medio de inhibidores de la NOS. Estos resultados sugieren que aún en la ausencia de muerte neuronal significativa los procesos inflamatorios, los cuales son transmitidos vía metabolitos de NO, pueden afectar funciones intrínsecas de las neuronas como cambios en la morfología, y así contribuir a los cambios degenerativos en la EA (Münch *et al.*, 2003). Los astrocitos también tienen participación importante en la EA, ya que se propone que bajo la estimulación de IL-1 α e IL-1 β , puede activar NOS para producir NO, dañando a las neuronas (Tuppo y Arias, 2005). La inhibición de NOS en ratones transgénicos de APP, generó un daño tipo Alzheimer y paralelamente fueron observadas alteraciones conductuales menores (Wilcock *et al.*, 2008).

Para el mejor diagnóstico de demencia tipo Alzheimer, se requiere de más de un ensayo con marcadores biológicos y que a su vez sean complementados con otros estudios. Los biomarcadores basados en la detección de proteínas alteradas en diferentes fluidos, la identificación de la neurodegeneración asociada a la atrofia de ciertas regiones, y el uso de estudios de imagen pueden ayudar a que en conjunto se identifique y diferencie la EA de otro tipo de demencias.

Existen algunos marcadores biológicos en diferentes tipos de muestra. En este trabajo, proponemos la obtención de una muestra no invasiva a partir de muestra de sangre para obtener información de diversas moléculas. Existe evidencia de que un incremento en la secreción de IL-6 en sangre periférica en pacientes con EA a comparación de pacientes controles (Ravaglia *et al.*, 2007). El propósito del trabajo es hacer una correlación entre los cambios neuropatológicos del cerebro adulto con la manifestación clínica de la EA. Existen estudios por separado en diferentes áreas para acercarse a un diagnóstico *ante mortem* de EA. En el área clínica existen exámenes de rutina en sangre, estudios de imagen (IRMf, TOC), evaluaciones neurofisiológicas y neuropsicológicas para incrementar la probabilidad de excluir otras enfermedades de la EA, aunque no se realizan de manera conjunta, y el realizar los estudios por separado no es suficiente para diferenciar la EA en sus fases iniciales de las características de una persona de edad avanzada sin daño cognoscitivo. Actualmente existe un avance en la búsqueda de marcadores periféricos, y al respecto Bush y colaboradores (1990) encontraron APP en plaquetas de pacientes en estado medio y terminal de EA. También está reportada una disminución en la expresión de A β 42 en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA (Andersen *et al.*, 1999). No está descrito aún porqué el nivel de A β 42 está disminuido en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA, mientras que A β 42 está aumentado en SNC; posiblemente las placas seniles en el cerebro actúan como blanco y capturan todo el A β 42, teniendo como consecuencia poca expresión en líquido cefalorraquídeo. Los cambios

neurodegenerativos en la EA están acompañados de una reacción inflamatoria, así el objetivo es reducir con fármacos anti-inflamatorios la expresión de citocinas como IL1, IL6 y TNF α . Al respecto, el grupo de Bancher en 1998, reportó un aumento en la expresión de éstas citocinas en líquido cefalorraquídeo, aunque estos resultados, no son suficientes para hacer un diagnóstico definitivo de la EA. Los datos encontrados en sistema nervioso periférico de pacientes con EA, ayuda a validar y a discriminar cuándo se trata de una enfermedad sistémica o cuándo se encuentra limitada al SNC, asimismo contribuye a visualizar la progresión de la enfermedad en los pacientes. Encontrar un marcador periférico para el diagnóstico de la EA, como marcador único y no como indicativo de la etiología básica de la EA, es un progreso significativo para el estudio de esta enfermedad. Las características que debe de cumplir un marcador biológico son: 1. Una alta especificidad (distinguir entre EA y otras demencias). 2. Que sea sensible (que diagnostique a cada paciente con EA). 3. Que sea capaz de detectar la enfermedad de manera temprana. 4. Que pueda monitorear la progresión de la enfermedad. 5. Que la muestra sea de fácil acceso. 6. Que pueda utilizarse como un procedimiento de rutina.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza clínicamente por un deterioro progresivo de las Funciones Cerebrales Superiores (FCS), las cuales son evaluadas por pruebas neuropsicológicas. Para tener un diagnóstico más completo de éste padecimiento, y para entender mejor la EA, se deben conjuntar diferentes metodologías, ya que el estudio por separado de la enfermedad hace más difícil entenderla. Así, se tienen que tomar en cuenta diferentes áreas de estudio como la biología molecular en asociación a los resultados de las pruebas neuropsicológicas.

Existe evidencia de que el péptido $A\beta_{25-35}$ induce inflamación crónica y que ésta contribuye a la neurodegeneración y al daño en la memoria espacial en ratas (Díaz *et al.*, 2012).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo aportó evidencia de la relación que existe entre los eventos de inflamación y la expresión de NO con los depósitos de $A\beta$. (Calvillo *et al.*, 2013), mostrando que la fracción $A\beta_{25-35}$, incrementa la producción de $IL1\beta$, $TNF\alpha$ y nitritos en cultivo celular. Así como el daño causado por el NO a la memoria espacial, al inyectar $A\beta_{25-35}$ en ratas (Limón *et al.*, 2009 (a); Limón *et al.*, 2009 (b); Díaz *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011). Por otro lado, también se da evidencia de que existe una alteración en los eventos de sialilación

de proteínas asociados a la alteración de la memoria, cuando se inyecta el péptido A β ₂₅₋₃₅ en hipocampo de ratas (Limón *et al.*, 2011).

Existe pérdida sináptica aproximadamente del 40% en el tejido de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) en comparación de controles (Terry *et al.*, 1991; Scheff y Price, 1993, DeKosky *et al.*, 1996). Aunque algunos reportes indican lo contrario, se demostró que aparentemente no existe diferencia significativa en la densidad sináptica. Estos datos se analizaron por cuantificación de la inmunoreactividad a la sinaptofisina, entre los casos con EA y controles (Guevara *et al.*, 2004). Existen reportes que apoyan la presencia de estructuras que participan en el crecimiento y modelación sináptica que se asocian a las PNs, al respecto Masliah y cols. (1994), analizan la expresión de SP11 y p65 en asociación a subpoblaciones de neuritas y PNs en hipocampo, donde proponen que existe un daño sináptico y axonal para la formación de PNs en EA. Desde 1985, se ha propuesto un evento de plasticidad en la EA basándose en el mantenimiento de la densidad de espinas dendríticas en fibras colinérgicas comparadas entre EA y controles, explican la existencia de terminales nerviosas en crecimiento (sprouting) (Gertz *et al.*, 1987; Geddes *et al.*, 1985), y apoyan la idea de que en el SNC existen respuestas de plasticidad y adaptativas que participan en los eventos de neurodegeneración, específicamente en EA.

La expresión de receptores a factores tróficos y moléculas de adhesión celular, nos permiten evaluar si existe plasticidad en los cerebros con EA. Existen evidencias de que el IGF-II puede bloquear la actividad neurotóxica de los péptidos derivados de la proteína A β en neuronas en cultivo (Dore *et al.*, 1997). Se

propone que éste péptido modula la actividad colinérgica. La expresión de factores tróficos como GAP-43 e IGF-II, sugieren un proceso de regeneración. Ambos son factores tróficos que se expresan en forma exclusiva en el estado fetal y no en la forma adulta en el SNC (De la Monte *et al.*, 1995). Por otro lado, la presencia de la cadherina de adhesión celular neural (NCAM) contribuye a que las neuronas mantengan sus contactos sinápticos. Esto garantiza una transmisión correcta de las señales entre las células. La cadherina de adhesión celular neural en su forma polisialilada (NCAM-PSA) se expresa normalmente durante la embriogénesis. Aunque está demostrado que participa en la restauración y reparación de los circuitos nerviosos dañados. Durante el desarrollo del SNC se observa que NCAM-PSA promueve la plasticidad mediante la interacción célula-célula durante la migración celular y el desarrollo neurítico (Cotman *et al.*, 1998; Ronn *et al.*, 2000; Kiss y Muller, 2001).

Debido a que el diagnóstico definitivo de EA es *post mortem*, es importante obtener información sobre el deterioro cognitivo que presentan los pacientes, y los cambios patológicos. Existen trabajos que apoyan la idea de que el estudio por separado hace más difícil entender esta enfermedad (Dickson *et al.*, 1992). Establecer el diagnóstico de EA se facilita cuando los cambios en el comportamiento son obvios, aunque en realidad es importante tener un diagnóstico temprano, lo cual resulta complicado, ya que se requiere de estudios neurológicos, neuropsicológicos adecuados y también, es importante apoyarse de

técnicas de laboratorio, neurofisiológicas y de imagen, con el fin de determinar la etiología del deterioro mental, ya que no es suficiente basarse en un diagnóstico exclusivo de deficiencia cognoscitiva. En resumen, es necesario un estudio multidisciplinario, tomando en cuenta diferentes factores involucrados en la EA.

Como hemos observado, en la búsqueda de marcadores moleculares asociados a esta enfermedad, se estudia la expresión de moléculas pro-inflamatorias (TNF α , IL1 β , IL-6, IL-8, IL12p70, IL-10), ya que el evento de inflamación está asociado con la EA, así como se ha reportado una disminución en los niveles de NO, el cual correlaciona con el deterioro cognoscitivo de los pacientes.

Basándose en dichas evidencias se decidió trabajar con una población de referencia, en la cual se estudió la correlación de marcadores moleculares *post mortem*, tomando en cuenta los factores tróficos (IGFs, GAP-43 y NCAM-PSA) y las lesiones histopatológicas características de la EA (PNs, MNFs, NDs y EM).y evaluación neuropsicológica. La información obtenida abrió paso a continuar con el mismo trabajo este trabajo en pacientes con esta enfermedad pero ahora en vida. Por lo que se le da un peso importante a la obtención de muestras no invasivas y la correlación de proteínas con la evaluación neuropsicológica, a pesar del empleo de esta estrategia, falta mucho por explorar. Así, se propone que el daño causado en el cerebro de pacientes con EA, tiene como consecuencia la expresión sistémica de marcadores moleculares que correlacionan con el daño cognoscitivo de los pacientes. Se busca proponer un método de diagnóstico

temprano para los pacientes con enfermedad de Alzheimer, por medio de la correlación de los resultados de la evaluación neuropsicológica y los diferentes marcadores moleculares estudiados.

JUSTIFICACION

En la actualidad uno de cada 20 mexicanos pertenece al grupo de los habitantes de 65 años y más, en tanto que las proyecciones apuntan que, en 2030, la relación será uno de cada ocho y 20 años más tarde, en 2050, será uno de cada cuatro. Así, los ancianos representarán un porcentaje importante en la estructura poblacional y en el área de la salud, ya que existen día a día más enfermedades relacionadas con el avance de la edad. De las enfermedades que más caracterizan a la población anciana son las demencias, siendo la más común la Demencia tipo Alzheimer, es por eso la importancia de acercarse a un diagnóstico temprano, completo y certero de esta enfermedad, por medio de estudios multidisciplinarios, con el fin de atender lo antes posible al paciente, así como ofrecerle un tratamiento adecuado y una mejor calidad de vida.

HIPÓTESIS

El daño causado en el cerebro de pacientes con EA tiene como consecuencia la expresión sistémica de marcadores de inflamación y estrés oxidativo que correlacionan con el daño cognoscitivo de los pacientes.

OBJETIVO GENERAL

Proponer un método de diagnóstico temprano para los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, por medio de la correlación de los resultados de la evaluación neuropsicológica y los diferentes marcadores moleculares estudiados.

METAS

1. Realizar la evaluación neuropsicológica a pacientes con diagnóstico de demencia tipo Alzheimer y a adultos mayores sin deterioro cognoscitivo como sujetos control.
2. Cuantificar citocinas (IL1 β , IL6, TNF α , IL8, IL10, IL12p70) en sangre.
3. Cuantificar nitritos en sangre.
4. Hacer un análisis estadístico de correlación entre los resultados de las evaluaciones neuropsicológicas y los diferentes marcadores biológicos encontrados en los pacientes.

METODOLOGÍA

Muestras.

Se aplicó la evaluación neuropsicológica a un total de 56 sujetos mayores de 60 años, divididos en dos grupos: grupo control (n=44) y grupo de demencia (n=12). Los sujetos fueron captados del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, M.V.S., y del DEPeI, Facultad de Odontología, UNAM.

Criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios para incluir pacientes en el estudio son:

- Diagnóstico clínico de Demencia tipo Alzheimer, leve a moderado.
- Pertenecer al grupo de apoyo para pacientes con EA del INNN o ser pacientes de la clínica del Posgrado de Odontología de la UNAM.
- Ser mayores de 60 años.

Los criterios para excluir a pacientes del estudio son:

- Cuando las personas o responsables de éstas no estén de acuerdo con la toma de las muestras.
- Cuando el paciente presente lesiones inflamatorias notorias en la mucosa bucal.
- Padecer enfermedades bucales.
- Padecer otra enfermedad neurodegenerativa.
- Ser menor de 60 años.

Consideraciones éticas.

Se elaboró una Historia Clínica. La recolección de las muestras y la evaluación neuropsicológica fue con carta de consentimiento informado, firmada por los familiares responsables del paciente o por él mismo.

Evaluación Neuropsicológica.

Se utilizaron las siguientes pruebas neuropsicológicas:

- Mini Examen del Estado Mental, "Minimental"
- Test de Aprendizaje Verbal California
- Figura compleja de Rey-Osterrieth
- Subescala de Memoria de Wechsler (Dígitos)
- Test del Reloj
- Stroop Test
- Cuestionario de Memoria Subjetiva de Bennett
- Test de Denominación de Boston
- Test de Fluidez Verbal (P, M, R y animales)
- Test de Beck para Depresión
- Evaluación clínica de la Demencia (CDR)
- Escala de Lawton y Brody
- Cuestionario de información sobre deterioro cognoscitivo

Toma de muestras:

La toma de muestra de sangre se realizó con un ayuno mínimo de 8 horas. Se obtuvo de 6 a 12 ml de muestra en tubos vacutainer (BD Vacutainer, Serum, Sterile).

Análisis de marcadores.

Se determinó la concentración de citocinas: IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8, IL-10 e IL-12p70, por medio de la técnica de CBA (Cytometric Bead Array Assay, Becton Dickinson Biosciences, San Diego, CA), y de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se analizó su expresión por citometría de flujo (FACS Calibur, Becton) en muestras de suero.

Una forma de detectar la participación de NO es cuantificar los nitritos (NO₂⁻), ya que es un producto estable y no volátil del NO. Se cuantificó la expresión de nitritos por medio de la técnica de Griess (Griess Reagent System, Promega Corporation) en muestras de suero.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos hasta el momento, se utilizó el programa SPSS 20.0. Debido a que los resultados de las citocinas no presentan una distribución Gaussiana (De Luigi *et al.*, 2002; Lombardi *et al.*, 1999), y también de acuerdo a los parámetros que se toman en cuenta para realizar una estadística no paramétrica, como el número de sujetos por grupo, para las comparaciones entre los grupos de la cuantificación tanto de citocinas como de nitritos, se realizó la prueba estadística no paramétrica U- Mann Whitney.

Para todos los análisis estadísticos, se tomó en cuenta el valor $P < 0.05$ como indicador de significancia entre los grupos.

Población de referencia.

Evaluación neuropsicológica.

Los datos clínicos que se obtuvieron de los pacientes, se analizaron con un enfoque multidisciplinario. Se abordaron simultáneamente los aspectos bioéticos, deontológicos, clínico-patológicos, epidemiológicos, genético-epidemiológicos, sociográficos, genético-moleculares, tóxico-ambientales, bioquímicos, psicológicos y neurológicos. Cada paciente fue evaluado constantemente en el avance de su enfermedad. Se obtuvo un historial completo con evaluaciones neuro-psicológicas periódicas (cada 6 meses) hasta la muerte del paciente. Este mismo modelo se utilizó para voluntarios sanos (sin diagnóstico de demencia) que al final consintieron la donación de su cerebro para la investigación.

Se confirmó el diagnóstico de demencia tipo Alzheimer (DA) en 11 pacientes. Se utilizó la batería de pruebas neuropsicológicas PENO (Protocolo de Evaluación Neuropsicológica Óptima). Está reportado que esta batería de pruebas es completa y capaz de identificar de manera óptima una demencia, a diferencia de otras pruebas en donde sólo se descarta o afirma un daño cognitivo. Los 13 casos control (sin demencia) fueron diagnosticados sólo con algunas pruebas de la batería del PENO, suficiente para descartar un daño cognitivo sin la inversión del tiempo necesario en la aplicación de la batería completa. El PENO consta de un conjunto de 20 pruebas que evalúa memoria, lenguaje, praxias, gnosis y funciones ejecutivas.

Se contó con los puntajes obtenidos para cada prueba, y para cada una de las evaluaciones periódicas de los pacientes. Esto dió como resultado un conocimiento completo de la evolución clínica de la EA en cada paciente.

Experimentos con tejido cerebral humano.

Debido a que no existe un modelo animal para el estudio de la EA y al desconocimiento de sus causas, se hace indispensable el poder hacer investigación básica con tejido cerebral humano en condiciones óptimas. De ésta premisa surge el concepto de Banco de Cerebros. El tejido humano que se utilizó en este proyecto se obtuvo del Banco de Cerebros del “Projet Image” (Projet Image – Centre Hospitalier Côte-des-Neiges y del Douglas Hospital; Montréal, Canadá).

Obtención y preparación del tejido cerebral humano.

El tejido fue clasificado y diagnosticado por dos neuropatólogos en forma individual con los criterios de NINCDS / RCDA (Khachaturian, 1985, Mirra *et al.*, 1991). Mediante el protocolo de disección del mismo banco se obtuvieron 11 regiones cerebrales susceptibles de daño. La disección se hizo después de la inspección anatomopatológica macroscópica. Se procesaron al mismo tiempo los dos hemisferios. Inmediatamente al muestreo de las 11 regiones (que son fijadas por inmersión en 4% de paraformaldehído amortiguado), el cerebro se cortó por el cuerpo calloso y se separó en dos hemisferios.

Se cortó en secciones coronales a partir del polo frontal y hasta el occipital, en rebanadas de 1 cm y se fijaron por inmersión en una solución de 4% de paraformaldehído en amortiguador salino de fosfatos (PBS) (0.015 M fosfato de sodio, 0.15 M NaCl, 18 μ M CaCl₂, pH 7.4) a 4°C por al menos 36 horas. Una vez que se obtuvieron las muestras, fueron deshidratadas mediante inmersión en alcoholes de concentración progresiva 70, 96 y 100%, 3 min en cada uno. Posteriormente en xilol absoluto por 10 min, y a continuación fueron incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 6 μ m, y fueron adheridos a portaobjetos tratados previamente con silano. Antes de ser aplicadas las técnicas correspondientes a los cortes de tejido, se les eliminó la parafina mediante una inmersión en xilol absoluto, por 20 min. Posteriormente fueron rehidratados mediante su inmersión consecutiva en alcoholes al 100, 96 y 70%, 3 min en cada uno. Finalmente se sumergieron en agua destilada por un minuto.

Inmunohistoquímica.

El tejido se incubó en PBS. Después en una solución al 0.5% de albúmina bovina libre de inmunoglobulinas en PBS, durante 30 min. Las laminillas se lavaron en PBS con 0.2% de Triton X-100, durante 10 min. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: policlonal de conejo contra la proteína amiloide- β (dilución 1:50) (Chemicon, International Inc.), anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína GAP-43 (anti-GAP-43, dilución 1:500) (Chemicon, International Inc.), anticuerpo monoclonal de ratón anti-sinaptofisina humana (EP-10 dilución 1:2000) (Chemicon, International Inc. Temecula, CA), anticuerpo monoclonal de ratón anti-tau hiperfosforilada (Santa Cruz, Co. CA) y el anticuerpo "AD2" (dilución 1:500),

gentilmente donado por el Dr. André Delacourte. INSERM, Lille, Francia). En el caso de la inmunohistoquímica para el péptido del amiloide- β , las laminillas se incubaron previamente con ácido fórmico al 98% (Merck. Darmstand, Germany) durante 8 min. Utilizamos inmunodetección indirecta con anticuerpos secundarios bioespecíficos conjugados con Lisamina-Rodamina y un secundario conjugado con FITC (Fluoresceina) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA). Las laminillas se montaron con Vectashield-DAPI (VECTOR Laboratories, Inc.).

Microscopía Confocal.

Se utilizó el sistema ZEISS-LSM 400. Para cada imagen analizada entre 10 y 20 secciones ópticas, con un grosor óptico de 0.5 a 1.0 μm de intervalo en el eje Z, fueron capturadas con objetivos de 20x (MNFs), de inmersión en aceite de 40x (PNs) y de 60x para la estructura fina. Las imágenes se obtuvieron en los dos canales de forma simultánea y se proyectaron en un plano de dos dimensiones. Mediante un sistema digital de pseudocolor, las imágenes se sobrepusieron (verde para FITC y rojo para Rodamina). En las imágenes sobrepuestas, el color amarillo se interpretó como colocación de los dos marcadores. Se obtuvieron impresiones directas en una impresora Epson stylus photo.

Análisis de imágenes.

Para la cuantificación de las estructuras, se utilizó un sistema digitalizador para la cuantimetría y morfometría de estructuras. Se utilizó el sistema IBAS que forma parte del sistema confocal ZEISS-LSM 400. La cuantificación de las

diferentes estructuras dependió del tipo particular de imagen obtenida. En general, las imágenes se descompusieron en sus dos canales originales y se cuantificó a partir de la señal individual para evitar interpretaciones erróneas o confusión por contaminación del segundo canal. En las imágenes de densidad se cuantifica la imagen obtenida en el canal de luz transmitida. Se considera el número de píxeles en el máximo de resolución del sistema (1200 X 1200) y los valores se dan en una escala de grises de 250 tonos. La cuantificación de los diferentes tipos de placas se utilizó el sistema digitalizador (MCID Image analysis system, Imaging Research Inc., Ontario, Canadá) en donde la totalidad de tejido utilizado es obtenido como una imagen digitalizada para darnos inmediatamente el área total del tejido. El sistema proporciona de manera homogénea las mediciones de área de todas las preparaciones incluidas en el estudio.

Estadística.

Se utilizaron las siguientes pruebas estadísticas:

- ✓ ANOVA de una vía y prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tuckey (GraphPad Prism y SPSS), para comparar las medias de los resultados tanto de la evaluación neuropsicológica, como de las medias de los resultados de la expresión de los diferentes marcadores, entre el grupo control y con EA en las diferentes áreas cerebrales.
- ✓ Análisis multivariable y de correlación de Spearman (SPSS), para realizar el análisis de correlación entre los resultados de la evaluación neuropsicológica y los resultados de la expresión de los diferentes marcadores.

- ✓ Puntuación z (Excel), para estandarización de los datos entre los resultados obtenidos en la evaluación de las FCS.

RESULTADOS

Población de referencia

Evaluación neuropsicológica

Se les aplicó a los pacientes la batería de pruebas neuropsicológica PENO de manera periódica (cada 6 meses) hasta el momento de su fallecimiento. Los pacientes con diagnóstico de DA, mostraron un mayor deterioro cognitivo que los controles, en las pruebas de memoria, lenguaje, gnosis, viso-constructivo, praxias y atención espacial, en ese orden (Figura 1). Se puede observar que salen del patrón cognitivo los pacientes 1, 3, 9 y 11, de los cuales 3 de ellos muestran una variante de EA: pacientes 1 y 11: Cuerpos de Lewy; paciente 9: Daño vascular.

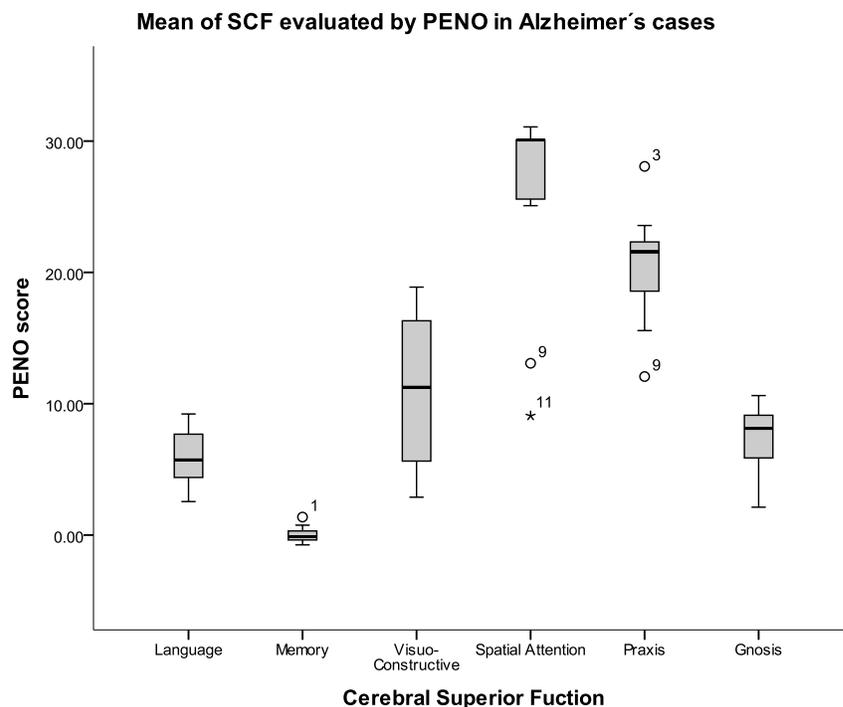


Figura 1. Deterioro cognitivo evaluado por funciones. Se muestra la afectación de las diferentes FCS evaluadas en los pacientes con EA. La función cognitiva con mayor afectación es la memoria.

Cuantificación de lesiones

En cuanto a las lesiones histopatológicas, se observó por medio de microscopía confocal, la expresión de los diferentes marcadores: Placas, MN, ND, GAP-43 y EM en los casos con EA (Figs. 2 – 7). Se realizó tanto para el hemisferio izquierdo como el derecho por separado, la cuantificación de estructuras inmunorreactivas a: Placas positivas a A β , Tau y A β +Tau; Marañas Neurofibrilares (MNFs); Neuritas Distróficas (NDs), GAP-43 y Estructuras Meganeuríticas (EM). La expresión de las estructuras fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los casos con EA en comparación de los controles. Excepto para la expresión de Placas positivas a A β . La densidad de los agregados neuríticos para los casos con EA fueron: Placas positivas a A β = 2.3 ± 0.7 ; Placas positivas a Tau = 21.9 ± 7.1 ; Placas positivas a A β +Tau = 20.5 ± 5.1 , mientras que en los controles fue de: Placas positivas a A β = 5.7 ± 4.0 ; Placas positivas a Tau = 0.01 y Placas positivas a A β +Tau = 0.5 ± 0.4 . La densidad promedio de las MNFs fue de $25.8 \pm 3.34 / \text{mm}^2$ para los casos de EA y de $0.29 \pm 0.28 / \text{mm}^2$ para los casos controles. La densidad promedio de las NDs fue de $5132 \pm 512 / \text{mm}^2$ en los casos de EA, mientras que en los casos controles se observó una densidad promedio de $9.5 / \text{mm}^2$. La densidad media de las estructuras positivas a GAP-43 fue de $1759.23 \pm 623.09 / \text{mm}^2$, mientras que para los controles fue de 39.46 ± 39.46 . Las EM tuvieron una densidad media de $1.9 \pm 0.6 / \text{mm}^2$ para los casos con EA. La cuantificación de las lesiones se realizó en las regiones 2, 4, 6 y 7. Sólo en el caso

de la cuantificación de las EM, se realizó en las 11 regiones, que incluyen las 6 funciones cognitivas evaluadas (Figuras 2 – 7).

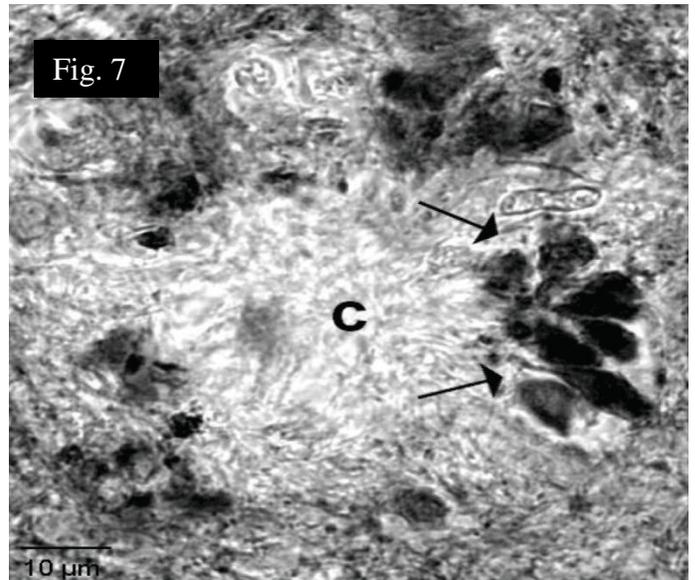
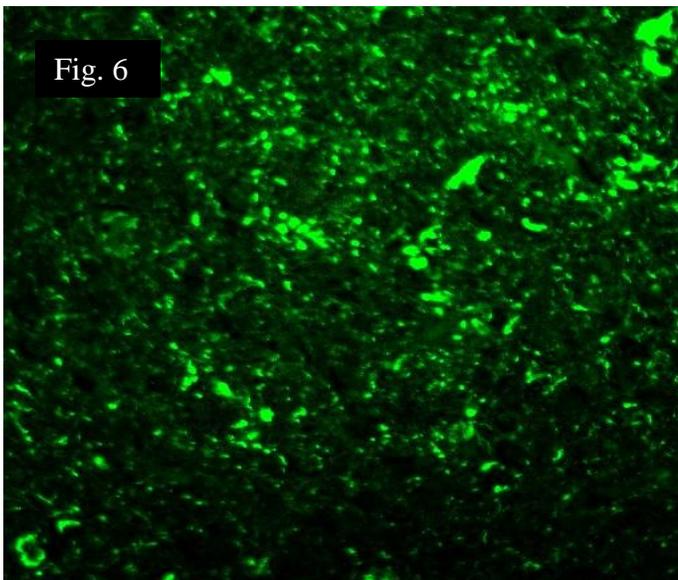
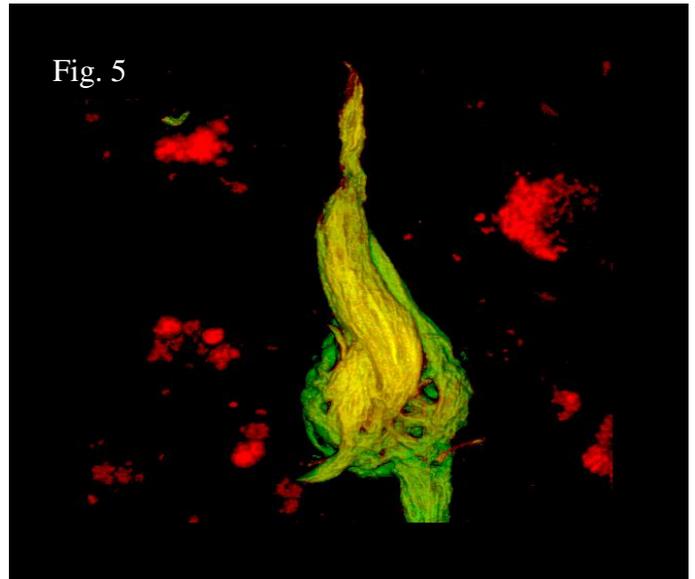
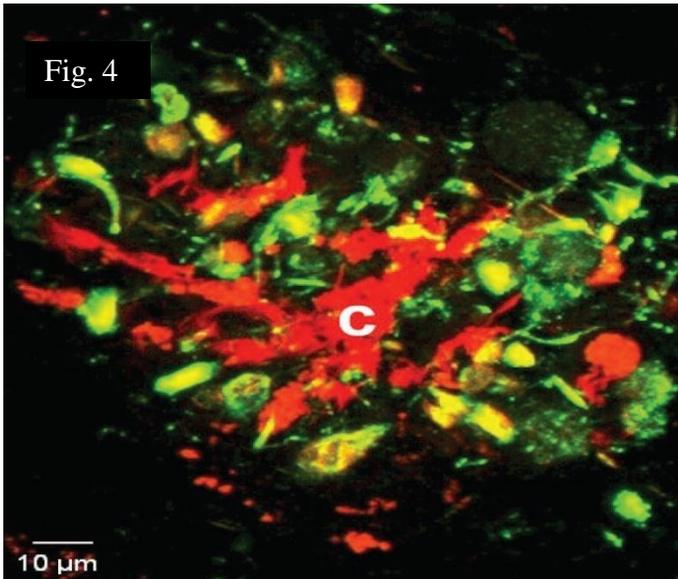
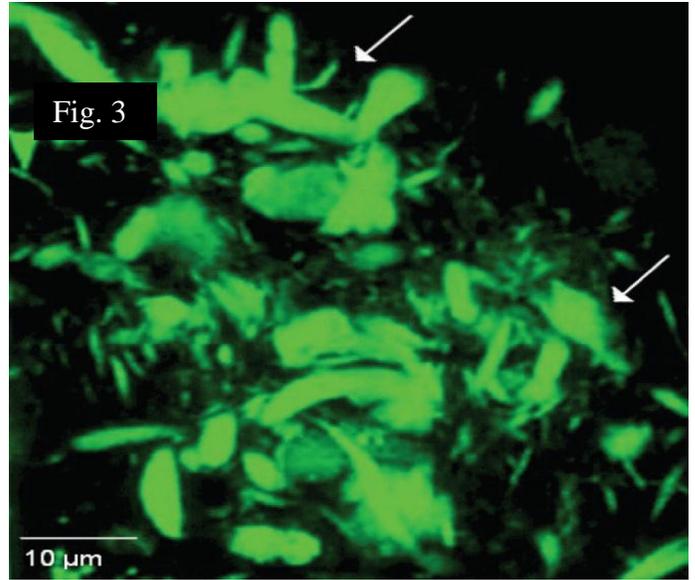
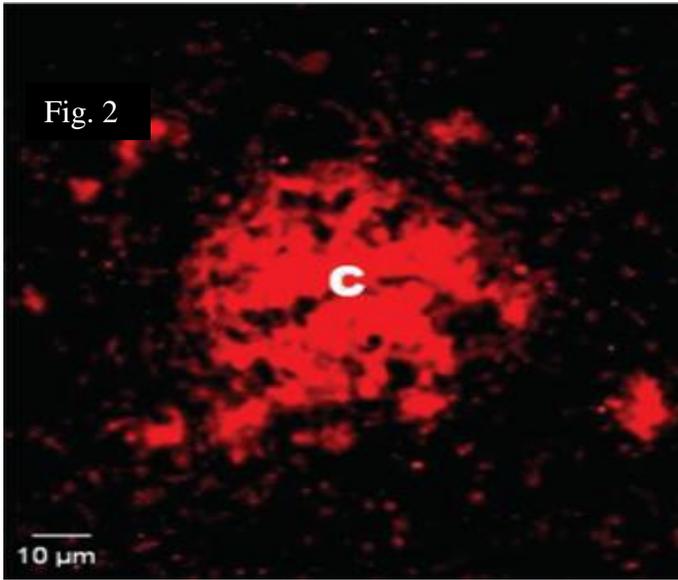


Fig. 2 Depósitos de amiloide-β. Micrografía confocal que muestra en rojo una estructura inmunorreactiva al anticuerpo anti amiloide-β (c). Este tipo de lesión fue encontrada principalmente en los controles sanos, en donde se observa la ausencia del componente neurítico.

Fig. 3 Tau hiperfosforilada. Micrografía confocal en donde se observa la inmunorreactividad al AcM AD2, tau hiperfosforilada (flechas).

Fig. 4 Imagen confocal con doble marca de una típica Placa Neurítica. En rojo se puede observar el depósito de amiloide-β (c) y en verde el componente neurítico distribuido en forma radial al depósito. Esta es la placa característica de la EA.

Fig. 5 Marañas neurofibrilares. Micrografía obtenida a partir de una doble marca de AD2 y rojo tiazina en microscopía confocal se muestra una reconstrucción 3-D de una MNF intracelular. En rojo se observa la autofluorescencia de la lipofuscina (Tomada de Guevara, 1998).

Fig. 6 Neuritas Distróficas. Micrografía de Neuritas Distróficas en un tejido de corteza de paciente diagnosticado con EA.

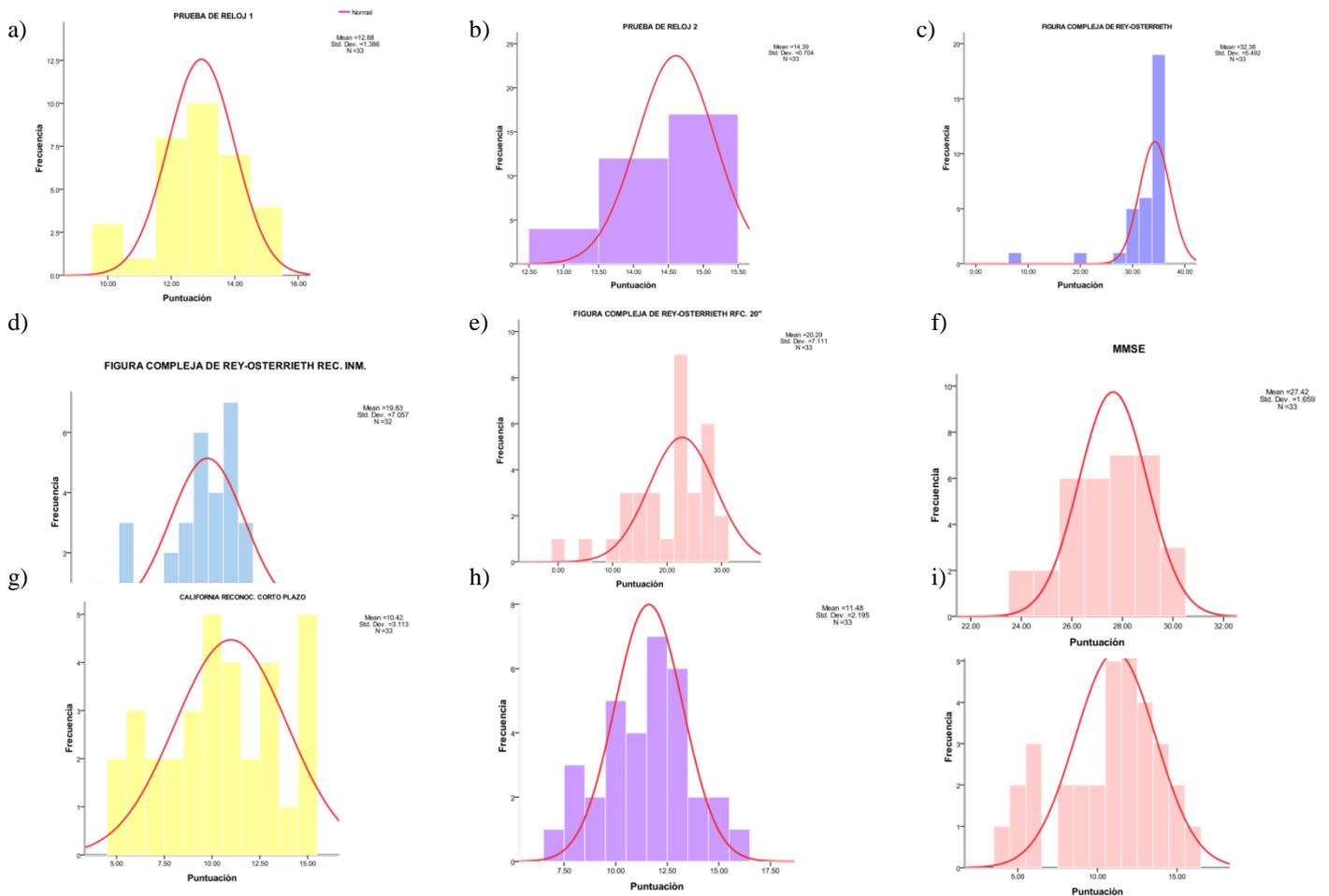
Fig. 7 Estructuras Meganeuríticas. Imagen de microscopía confocal, en donde podemos observar una placa característica de la EA (c), y la expresión de las EM alrededor de la placa de Aβ (flechas), en tejido de corteza de paciente diagnosticado con EA (Tomada de Guevara, 1998).

Correlación entre la evaluación neuropsicológica y las lesiones histopatológicas.

El análisis estadístico de esta población que sirvió de referencia indica que, existe correlación significativa ($p < 0.05$) entre los resultados de las pruebas neuropsicológicas y la expresión de los siguientes marcadores: EM, Placas positivas a Tau, MNFs, PNs, NDs, Placas de Aβ, GAP-43, en ese orden, para los casos de EA. Contrariamente, en los casos control sólo observamos una correlación significativa en la expresión de MNFs. La correlación en cuanto a las funciones involucradas con la expresión de los marcadores, es significativa ($p < 0.05$) para: Praxias, Lenguaje, Memoria, Viso-Constructivo, Gnosias y Atención Espacial en ese orden, para los casos de EA. En los casos control sólo se ven involucradas las funciones de Lenguaje y Memoria en ese orden.

Población mexicana Evaluación neuropsicológica

Se realizó a cada uno de los sujetos una historia clínica y se obtuvieron las puntuaciones para cada una de las pruebas neuropsicológicas. A pesar de que la mayoría de estas pruebas no están estandarizadas para nuestra población, para identificar los rangos de normalidad para esta población, los cuales corresponden con los rangos de normalidad de las pocas pruebas que si se encuentran estandarizadas para la población mexicana, se obtuvo una tabla de frecuencias e histogramas con las puntuaciones del grupo control para cada una de las pruebas (Figura 8 y 9).



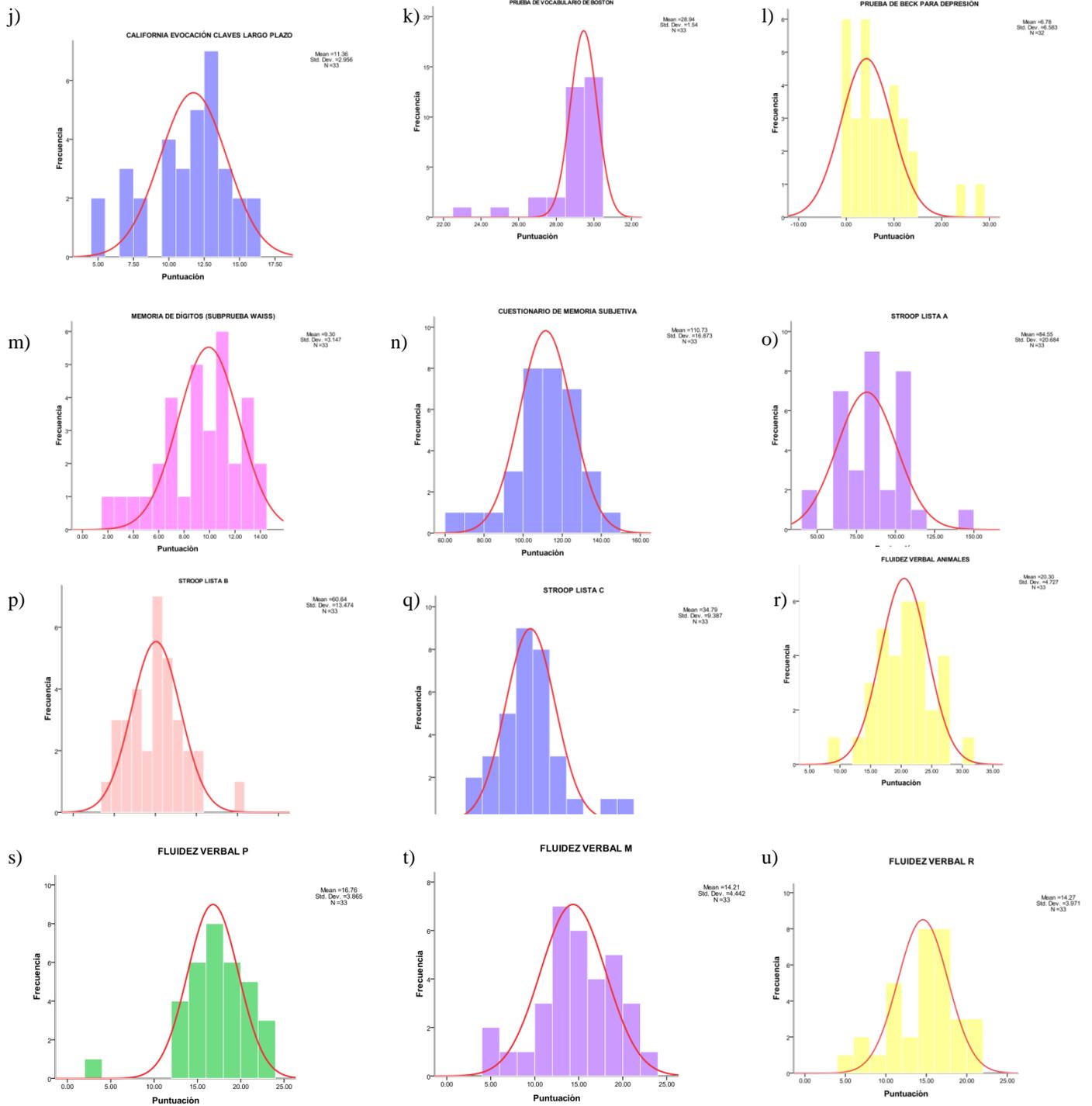


Figura 8. Histogramas de frecuencia. Se muestran los histogramas por prueba neuropsicológica para la obtención de los rangos de normalidad. a) Prueba de reloj 1 (Rango 11-15). b) Prueba de reloj 2 (13-15.5). c) Figura Compleja de Rey-Osterreth (30-40). d) Figura Compleja de Rey-Osterreth Recuerdo Inmediato (10-30). e) Figura Compleja de Rey-Osterreth RFC. 20" (15-30). f) MMSE, (25-30). g) California Reconocimiento a corto plazo (6-15). h) California Reconocimiento

con claves a corto plazo (9-15). i) California evocación a largo plazo (7-15). j) California Evocación con claves a largo plazo (8-15). k) Prueba de vocabulario de Boston (28-30). l) Prueba de Beck para depresión (2-10). m) Memoria de dígitos, subprueba del Waiss (6-13). n) Cuestionario de Memoria Subjetiva (100-130). o) Stroop Lista A (55-123). p) Stroop Lista B (40-80). q) Stroop lista C (25-50). r) Fluidez verbal Animales (17-23). s) Fluidez verbal P (14.5-19.5). t) Fluidez verbal M (12-18). u) Fluidez verbal R (11-17).

PRUEBA	INFERIOR	NORMAL	SUPERIOR	NORMAL ESTANDARIZADO												
Prueba de reloj 1	12	13	14	< 6 (Cacho et al, 1996)												
Prueba de reloj 2	13	14.5	15.5													
Figura Compleja de Rey-Osterreth	30	32	36	No existen datos normalizados para la población mexicana												
Figura Compleja de Rey-Osterreth Recuerdo Inmediato	10	20	30													
Figura Compleja de Rey-Osterreth RFC. 20*	15	21	30	No existen datos normalizados para la población mexicana												
California Reconocimiento a corto plazo	6	10	15													
California Reconocimiento con claves a corto plazo	9	12	15													
California evocación a largo plazo	7	11	15													
California Evocación con claves a largo plazo	8	12	15													
Prueba de vocabulario de Boston	28	29	30													
Prueba de Beck para depresión	2	7	10	5-9 Existencia de altibajos. 10-18 Depresión leve y moderada. 19-29 Depresión moderada y severa. 30-63 Depresión severa. (Bec, AT y Steer RA. Beck Depression Inventory Manual. San Antonio, Ex. The Psychological Corporation, 1993).												
Memoria de dígitos, subprueba del Waiss	6	9	13	<5 (Wechsler, Madrid, 1997)												
Cuestionario de Memoria Subjetiva	100	110	130	No existen datos normalizados para la población mexicana												
Stroop Lista A	55	85	123	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>46-64 años</td> <td>113</td> <td>71</td> <td>43</td> </tr> <tr> <td>65-80 años</td> <td>96</td> <td>54</td> <td>34</td> </tr> </tbody> </table>		A	B	C	46-64 años	113	71	43	65-80 años	96	54	34
	A	B	C													
46-64 años	113	71	43													
65-80 años	96	54	34													
Stroop Lista B	40	60	80													
Stroop lista C	25	36	50													
				(Golden CJ. Stroop test de colores y palabras. Manual. Madrid. Tea, 1994)												
MMSE	25	28	30	55 - 65 años												
				65-85 años												
				<table border="1"> <thead> <tr> <th>ESCOLARIDAD</th> <th>MINIMAL X+ -DE</th> <th>ESCOLARIDAD</th> <th>MINIMAL X+ -DE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5-9</td> <td>28.05(1.84)</td> <td>5-9</td> <td>26.57(2.54)</td> </tr> <tr> <td>> 10</td> <td>28.52(1.58)</td> <td>> 10</td> <td>27.56(2.24)</td> </tr> </tbody> </table>	ESCOLARIDAD	MINIMAL X+ -DE	ESCOLARIDAD	MINIMAL X+ -DE	5-9	28.05(1.84)	5-9	26.57(2.54)	> 10	28.52(1.58)	> 10	27.56(2.24)
ESCOLARIDAD	MINIMAL X+ -DE	ESCOLARIDAD	MINIMAL X+ -DE													
5-9	28.05(1.84)	5-9	26.57(2.54)													
> 10	28.52(1.58)	> 10	27.56(2.24)													
				(Dra Georgina Corte Franco, Psic. Xochitl Ortiz, Neuropsic. Feggy Ostrosky-Solis, 2001)												
Fluidez verbal P	14.5	17	19.5	No existen datos normalizados para la población mexicana												
Fluidez verbal M	12	14	18													
Fluidez verbal R	11	14	17													
Fluidez verbal Animales	17	20	23													

Figura 9. Tabla de frecuencia. Se muestran las puntuaciones por prueba neuropsicológica, en donde se pueden observar los rangos esperados para la población estudiada.

Posteriormente, se utilizó una prueba estadística U de Mann Whitney para comparar los resultados del grupo control y del grupo de demencia del promedio de los resultados de todas las pruebas neuropsicológicas (Figura 10).

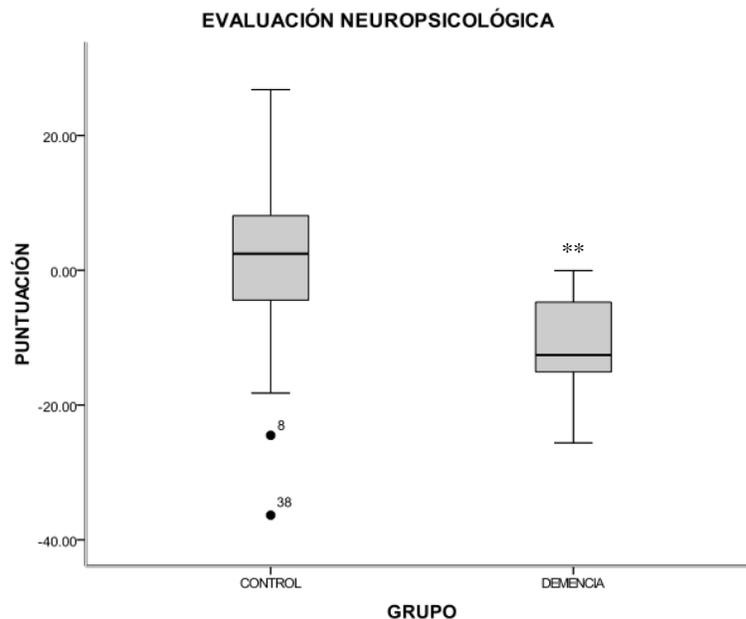


Figura 10. Gráfica general de los resultados de las evaluaciones neuropsicológicas. Se encontró una diferencia significativa (** $p=0.007$) entre los dos grupos (grupo control: $\mu=2.99 \pm 14.24$; grupo demencia: $\mu=-6.12 \pm 11.25$), mostrando que a mayor puntuación, menor deterioro cognoscitivo. Pacientes 8 y 38 con baja escolaridad (3º. Y 5º. de primaria) con respecto a los demás sujetos del grupo control.

De acuerdo a los puntajes de normalidad que son los esperados en las personas mayores de 60 años, los pacientes con demencia tienen un puntaje significativamente menor ($p=0.007$), lo que sugiere daño a nivel de las Funciones Cerebrales Superiores (FCS). Tomando en cuenta estos resultados, los pacientes fueron clasificados de acuerdo al puntaje obtenido en las pruebas neuropsicológicas, apoyado por un diagnóstico de demencia por parte de un neurólogo (para el grupo de demencia), y tomando en cuenta los criterios del DSM-IV (Pichot *et al.*, 2001). Se realizó el diagnóstico diferencial con enfermedades similares como el trastorno amnésico, el delirium y el trastorno de

depresión. Estos resultados nos demuestran una sensibilidad de la batería de pruebas para determinar si el deterioro cognoscitivo va de acuerdo al envejecimiento mismo o por un estado patológico, aunque todavía se tienen que captar controles de baja escolaridad para no exigir más al nivel de esta población.

Cuantificación de nitritos.

A todos los sujetos se les realizó la cuantificación de nitritos en muestras de suero de acuerdo a la técnica de Griess ($r=0.98$) para el grupo control y el grupo de demencia. Se utilizó una prueba estadística no paramétrica U de Mann-Withney (SPSS) para comparar la concentración de nitritos en los dos grupos (control y demencia). Como se observa en la figura 11, aunque no hay una diferencia significativa, se observa una disminución en el grupo de demencia. La presencia de NO en el suero de pacientes con demencia es controversial, ya que existen trabajos que sugieren el papel muy importante de NO dentro del evento de inflamación, aunque otros sugieren la disminución en los niveles de NO en estos pacientes, debido a un evento de nitrosilación. En nuestros ensayos consideramos necesario aumentar el número de casos del grupo de demencia para un análisis más concluyente.

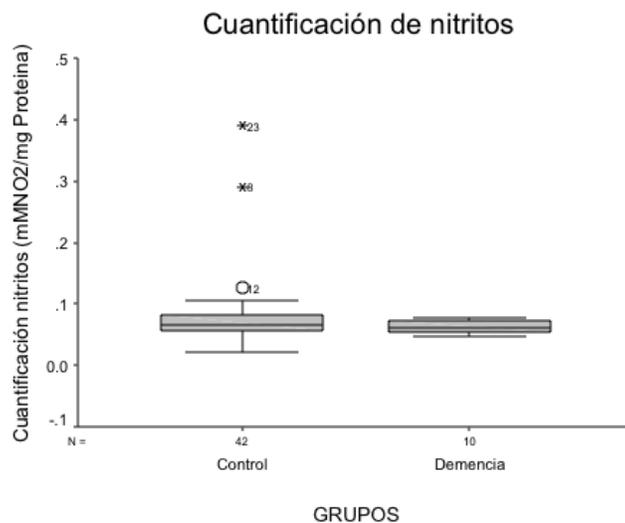


Figura 11. Concentración de nitritos por grupos. No existe diferencia significativa entre los dos grupos ($p=0.190$), aunque se observa una menor concentración en el grupo de demencia (grupo control: $\mu=0.0811\pm0.062$; grupo demencia: $\mu=0.0616\pm0.009$).

Cuantificación de citocinas.

Los niveles de concentración de las citocinas IL1 β , IL6, TNF α , IL8, IL10 e IL12p70 se analizaron con una prueba estadística U de Mann Whitney (SPSS) comparando el grupo control con el grupo de demencia (Figura 12).

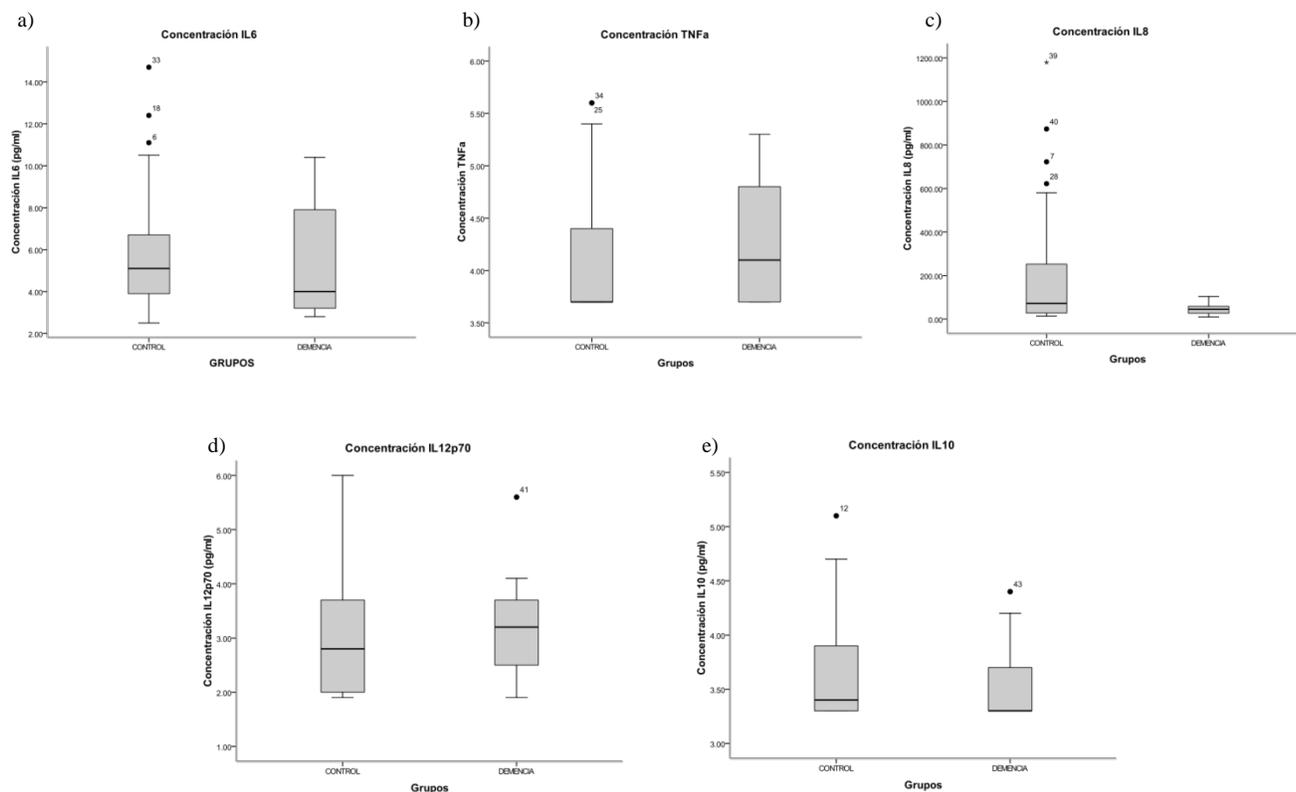


Figura 12. Concentración de citocinas por grupo. Se realizó la cuantificación de las citocinas por medio de la técnica de CBA para comparar entre el grupo control y el grupo de demencia. Observamos una mayor concentración de citocinas proinflamatorias (IL6, IL12p70 y TNF α) en el grupo de demencia.

En la gráfica 12a) se observa una menor concentración de IL6 en el grupo control ($\mu=5.58\pm 2.95$) que en el grupo de demencia ($\mu=5.82\pm 2.67$) aunque no hay diferencia significativa ($p=0.574$). 12b) Se observa una menor concentración de TNF α en el grupo control ($\mu=4.10\pm 0.62$) a diferencia del grupo de demencia ($\mu=4.23\pm 0.59$) aunque la diferencia no es significativa ($p=0.294$). 12c) Se observa una mayor concentración de IL8 en el grupo control ($\mu=189.73\pm 257.31$) que en el grupo de demencia ($\mu=44.19\pm 28.75$) aunque la diferencia no es significativa

($p=0.93$). 12d) Se observa una menor concentración de IL12p70 en el grupo control ($\mu=2.96\pm 1.06$) que en el grupo de demencia ($\mu=3.24\pm 1.15$) aunque la diferencia no es significativa ($p=0.561$). 12e) Se observa una mayor concentración de IL10 en el grupo control ($\mu=3.66\pm 0.47$) a comparación del grupo de demencia ($\mu=3.58\pm 0.42$) aunque la diferencia no es significativa ($p=0.656$). La concentración de IL1 β no se grafica debido a que la concentración en los dos grupos es no detectable (ND): grupo control ($\mu=7.21\pm 0.09$), grupo de demencia ($\mu=7.20\pm 0.00$), ($p=1.00$). Grado de detección mínimo para IL1 β de acuerdo al manual de instrucción de Human Inflammatory Cytokines Kit, CBA, es de 7.2 pg/ml.

Correlación de Spearman.

Existe una correlación inversa ($r=-1.00$) significativa ($p=0.01$) entre la evaluación neuropsicológica y la expresión de IL6, aunque no existe correlación significativa con las demás moléculas evaluadas: evaluación neuropsicológica y TNF α ($r=0.400$, $p=0.60$), evaluación neuropsicológica e IL8 ($r=-0.800$, $p=0.20$), evaluación neuropsicológica e IL10 ($r=0.200$, $p=0.80$) y evaluación neuropsicológica e IL12p70 ($r=0.800$, $p=0.20$) (figura 13).

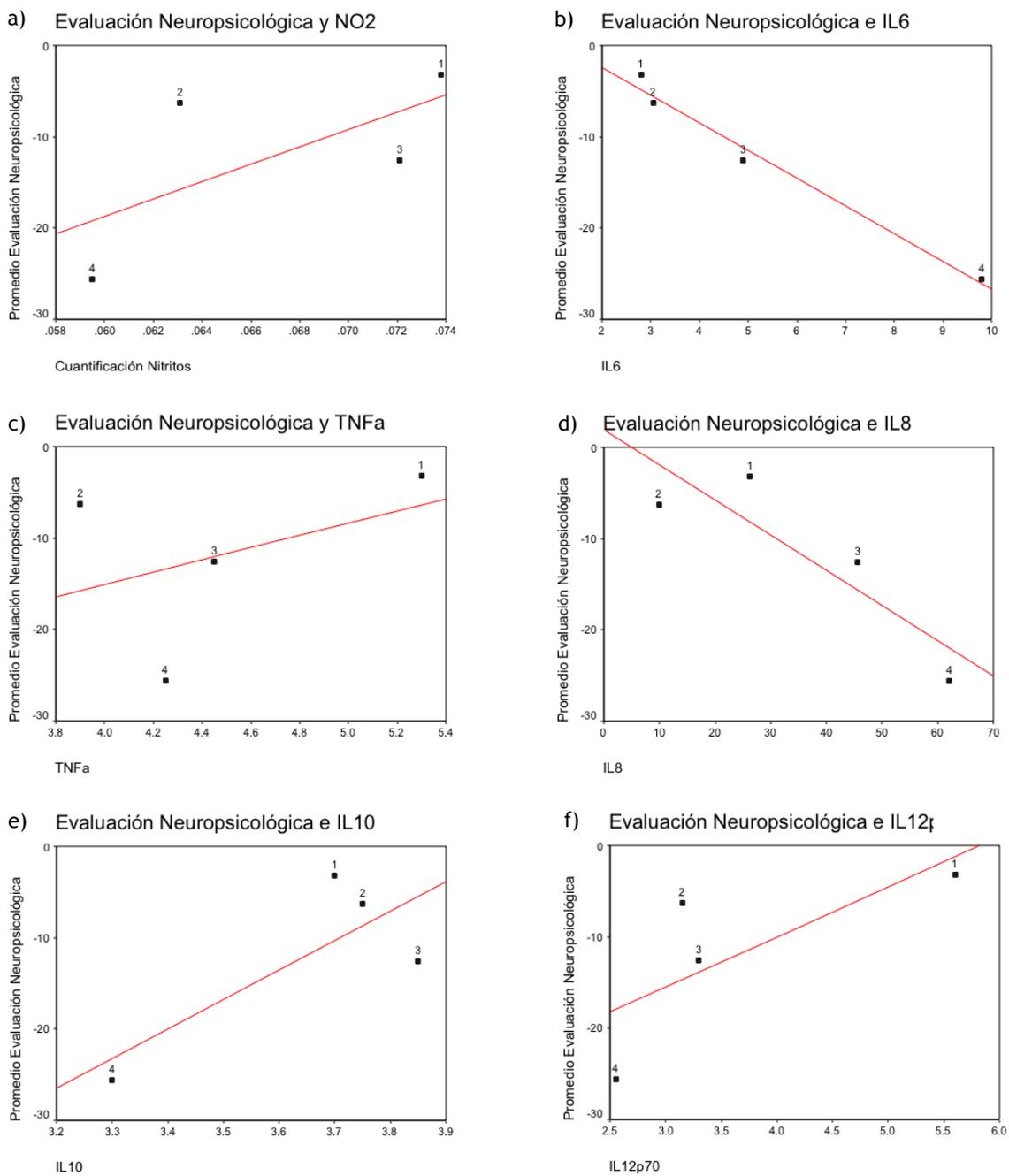


Figura 13. Correlación de Spearman entre la evaluación neuropsicológica y los diferentes marcadores. Existe correlación inversa con IL6 (significativa ($p=0.001$)) e IL8 y correlación directa no significativa con TNF α , IL10 e IL12p70.

DISCUSIÓN

Con este trabajo se logra resaltar la relevancia de un estudio multidisciplinario en el conocimiento de la enfermedad de Alzheimer, haciendo incapie en que una correcta evaluación neuropsicológica, en conjunto con el estudio de muestras sistémicas (no invasivas), nos amplían el conocimiento de esta patología, acercándonos más a la posibilidad de un diagnóstico temprano.

La población que se utilizó de referencia fue de gran aportación al presente trabajo ya que en Canadá se cuenta con una clasificación perfecta de la enfermedad, lo cual permitió ver el comportamiento de las lesiones principales en esta patología, así como el daño cognoscitivo. La falta de autopsias y bancos de cerebros en México hace difícil que esto suceda en el país. Otra aportación importante en el estudio de la población de referencia es que pude realizar una estancia en el Instituto de Geriatria de la Universidad de Montreal para el aprendizaje de la evaluación neuropsicológica en estos pacientes, lo cual permitió adaptar los puntajes de pruebas neuropsicológicas que no están estandarizadas para la población mexicana.

En la mayoría de los casos, se utiliza la prueba neuropsicológica MMSE como prueba de rutina para diagnosticar demencia tipo Alzheimer (Giordano *et al.*, 2010; Nordlund *et al.*, 2009) aunque en realidad sólo nos indica si existe un deterioro cognoscitivo o no, y no informa sobre el grado de severidad del deterioro, el cual es importante saber ya que existen diferentes tipos de demencia y diferentes grados de severidad. Así, con la batería de pruebas neuropsicológicas

que se aplicó en este trabajo, se propone tener una evaluación completa de las diferentes funciones cerebrales superiores. Se encontró una diferencia significativa entre los dos grupos, en donde a mayor puntaje, menor es el deterioro cognoscitivo, siendo un punto importante para considerar como parte del diagnóstico de estos pacientes en vida.

Nuestros resultados muestran que una menor puntuación se correlaciona con un deterioro a nivel de las Funciones Cerebrales Superiores. Aunque estos resultados son esperados ya que sabemos que en la EA existe deterioro cognoscitivo, es importante tomar en cuenta una batería completa para hacer más detallado el análisis por área cognoscitiva, y de igual manera, apoyarse de información complementaria como son los marcadores moleculares. Dentro de los pocos y primeros estudios que buscan una correlación entre el área cognoscitiva y diferentes marcadores moleculares, está el trabajo de Hulstaert, en donde él y su grupo de colaboradores (1999), reportaron una correlación entre los niveles de A β 42 en LCR y el puntaje de la prueba psicológica Minimental (MMSE) en hombres, pero no en mujeres con EA. Algunos estudios indican una correlación entre la expresión de A β , tau y p-tau en LCR y un estudio conductual y neuropsicológico en pacientes con EA y diferentes tipos de demencias (Engelborghs *et al.*, 2006, Engelborgh, 2013). Mattsson y su grupo de trabajo (2009), proponen que los niveles de A β 42, tau y p-tau pueden predecir e identificar pacientes con MCI, coincidiendo con los resultados de las pruebas de memoria. También correlaciona el déficit cognoscitivo de pacientes con EA y los niveles de

p-tau231 en LCR (Hampel *et al.*, 2001) y con p-tau181 (Vanmechelen *et al.*, 2001; Engelborghs *et al.*, 2006), en donde a mayor expresión de los marcadores biológicos, mayor es el deterioro cognoscitivo.

Doré y colaboradores (2013), realizaron un estudio en donde relacionaron la expresión de depósitos de A β por medio de estudios de Resonancia Magnética, y el deterioro en memoria con una batería de pruebas neuropsicológicas, y encontraron que si existe una asociación, afirmando que los depósitos de A β no se encuentran como parte de un proceso inicial, por lo tanto en intervenciones tempranas con terapia anti-A β , en estados tempranos, podría ser muy efectiva. Wirth *et al.*, (2013) realizaron estudios con TEP (tomografía por emisión de positrones) y mencionan que los biomarcadores asociados con la EA, se relacionan con el deterioro cognitivo de estos pacientes, principalmente en la evaluación de memoria y funciones ejecutivas, sin embargo no en el caso de las placas de A β , las cuales no muestran una asociación en individuos de edad avanzada sin deterioro cognitivo.

Mattsson y su grupo de colaboradores (2009, 2013) realizaron contribuciones importantes para el desarrollo de terapias en la EA basado en el estudio de biomarcadores como A β 42, t-tau y p-tau, y la evaluación clínica. Aunque todavía se recomienda afinar estos resultados, debido a que en algunos casos sólo se refleja la patología de la EA en pacientes con MCI, ellos mismos mencionan la necesidad de detallar las técnicas antes de ser utilizadas de manera general en la clínica (Shaw *et al.*, 2009), y que el análisis de marcadores debe ser

más extenso. Este, como algunos estudios de biomarcadores, sirve como exploración para entender mejor la EA, más no como diagnóstico, mencionando de manera importante, que trabajan con muestras invasivas.

Para reforzar la posibilidad de un diagnóstico para los pacientes, proponemos un estudio completo, en donde se correlacionen los resultados de una completa evaluación neuropsicológica con la concentración de proteínas que se relacionan con eventos fisiológicos que participan en esta enfermedad, como la inflamación (Kamer, 2010) y el estrés oxidante (Smith *et al.*, 2010, Nunomura *et al.*, 2009). Se ha observado que la inflamación juega un papel importante en esta patología (Schwab *et al.*, 2009). Recientes estudios indican que la inflamación crónica tiene un papel importante en la EA tanto en SNC como a nivel periférico. Se ha propuesto que las vías de señalización del proceso de inflamación comienzan en el cerebro y van hacia la periferia, aunque el mecanismo de inducción no es conocido (Song *et al.*, 1999). Por el contrario, existen reportes que apoyan la idea de que los procesos inflamatorios a nivel periférico, ocurren en estados tempranos de la EA (Galimberti *et al.*, 2005).

Existen resultados controversiales o contradictorios acerca de la producción de citocinas en pacientes con EA. Está demostrada una disminución en la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL12, interferon- γ (INF γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) en cultivo de células de sangre de pacientes con EA comparados con controles de la misma edad, sugiriendo una atenuación

en la respuesta inmune (Richartz *et al.*, 2005). Sin embargo, existe un decremento en la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL10 en PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) de pacientes con EA, estimuladas con el péptido A β (Arosio *et al.*, 2004). También existen estudios en donde se muestran niveles elevados de TNF α , IL1 β , IL6 e IL10 en cultivo celular de muestras de sangre de pacientes con EA a comparación de los controles, sugiriendo un evento proinflamatorio en la enfermedad (Remarque *et al.*, 2001). Estas contradicciones proponen que el evento de inflamación puede ser específico a los estados de deterioro de la enfermedad, un ejemplo es un trabajo en donde Sala y cols. (2003) encontraron un decremento en la producción de IL1 β e IL6 en células de sangre estimuladas en EA severo, pero no en pacientes con EA leve o moderado.

Se propone que existen cambios en la expresión de marcadores moleculares como citocinas en pacientes con MCI (deterioro cognoscitivo leve, del inglés: Mild Cognitive Impairment), los cuales regresan a sus niveles normales en EA moderado, y apoyando esta idea existen trabajos como el de Galimberti y cols (2005), que encuentran un incremento de la proteína 10 inducible de INF γ en LCR de pacientes con MCI pero ya no en EA. De igual manera se ha observado un decremento en IL1 β , IL6 y TNF α en sangre periférica con estimulación de LPS de pacientes con EA severo, con respecto al grupo control y pacientes con EA leve o moderado (Sala *et al.*, 2003).

En este trabajo se encontró mayor concentración de las citocinas proinflamatorias en el grupo de demencia (IL6, TNF α e IL12p70) a diferencia del

grupo control. Como hipótesis ante este incremento de citocinas proinflamatorias, se apoya la idea de que IL1 β , TNF α y principalmente IL6, participan en el evento de hiperfosforilación de TAU, ayudando también a al corte del APP por acción de las secretasas, formando así más fragmentos tóxicos y teniendo como consecuencia un evento de inflamación y un deterioro cognoscitivo en los pacientes (Maccioni *et al.*, 2009). A diferencia de estas citocinas, IL8, se encuentra con mayor concentración en el grupo control, la cual se propone juega un papel quimioatrayente en el evento de inflamación en la EA (Li *et al.*, 2009; Franciosi *et al.*, 2005). De acuerdo a diferentes autores, (Combarros *et al.*, 2009; Angelopoulos *et al.*, 2008), IL10 es una citocina antiinflamatoria, así es que como se esperaba, se encontró en menor concentración en el grupo de demencia, no siendo ya suficiente su expresión para contrarrestar los daños causados en esta enfermedad.

Ya que la inflamación puede darse como evento temprano y no como consecuencia tardía de la enfermedad (Galimberti *et al.*, 2005; Tarkowski *et al.*, 2003), podemos considerar que el aumento en la expresión de citocinas a nivel periférico, pueda anteceder y predecir el desarrollo clínico de la EA.

Aunque la inflamación no es el único evento que se ve involucrado en la EA. En SNC, la microglia tiene una participación importante en la producción de citocinas pro inflamatorias como IL1 β , IL6, TNF α (Lee *et al.*, 1993), siendo la única

en el SNC que expresa IL12p70 (Olso y Miller, 2004). De igual manera, con la estimulación de citocinas inflamatorias, participa así mismo en la estimulación de agonistas de TLR4 o TLR9, convirtiendo a neuronas y oligodendrocitos en citocidas, mecanismo dependiente de la producción de NO (Lehnardt *et al.*, 2003).

Existe una disminución en los niveles de NO, el cual correlaciona con el deterioro cognoscitivo de los pacientes con EA (Corzo *et al.*, 2007). Una forma de representar el nivel de expresión del NO, es por medio de la cuantificación de nitritos. Aunque existe evidencia de que NO puede regular efectos tanto protectores, por la vía de S-nitrosilación (Melino *et al.*, 1997; Tennesi *et al.*, 1997) y efectos neurotóxicos por medio de la formación de peroxinitrito (Lipton *et al.*, 1993). De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, observamos una diferencia en la concentración entre el grupo control y el grupo de demencia, mostrando una disminución en el último grupo, dato no significativo estadísticamente. Se propone aumentar el número de casos para el grupo de demencia para obtener un análisis más detallado.

La expresión de citocinas y NO a nivel periférico puede reflejar el inicio de la enfermedad, teniendo posteriormente un aumento en el SNC. Las citocinas reportadas que incrementan la permeabilidad de la Barrera Hematoencefálica (BHE) *in vitro* son IL6, TNF α , IL1 α , IL1 β e IFN γ (Deli *et al.*, 1995; Huynh y Dorovini, 1993).

Debido a que el diagnóstico definitivo de la Enfermedad de Alzheimer se lleva a cabo *post mortem*, con este estudio esperamos encontrar un método accesible, útil como marcador de diagnóstico temprano para la enfermedad de Alzheimer. Esto repercutirá principalmente en la calidad de vida de los pacientes, un tratamiento óptimo, así como contribuirá en la mayor comprensión del comportamiento biológico de la enfermedad.

CONCLUSIONES

- La batería de pruebas neuropsicológicas utilizadas en este proyecto muestran una sensibilidad para la identificación de un deterioro cognoscitivo a nivel de demencia.
- La concentración de citocinas en el grupo de demencia evidencian la participación del evento de inflamación en la EA.
- La concentración de nitritos en el grupo de demencia sugieren la participación del NO en la EA.
- La correlación mostrada entre la evaluación neuropsicológica y la expresión de citocinas y NO, muestran la participación de determinadas ILs en funciones cerebrales superiores específicas.

PERSPECTIVAS

- Realizar análisis de otros marcadores que apoyen el evento de glicosilación de proteínas (lectinas y sialiltransferasas) en muestras sistémicas (saliva), y correlacionar los resultados encontrados con los de la evaluación neuropsicológica ya obtenida.
- Estudios de Imagen por Resonancia Magnética Funcional (IRMf) a pacientes y controles, y correlacionar los resultados con los ya encontrados.

REFERENCIAS

Andersen N, Hesse C, Davidsson P, Minthon L, Wallin A, Winblad B, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K (1999). Cerebrospinal fluid b-amyloid (1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset al.,zheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neurol*, 673-680

Angelopoulos P, Agouridaki H, Vaiopoulos H, Siskou E, Doutsou K, Costa V, Baloyiannis SI. (2008). Cytokines in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int J Neurosci*. 118:1659-72

Annaert W. y De Strooper B (2002). A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18:25-51

Bancher C, Jellinger K, Wichart I (1998). Biological markers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 185-197

Batliwalla FM, Rufer N, Lansdrop PM, Gregersen PK (2000). Oligoclonal expansions in the CD8(+)/CD28(-) T cells largely explain the shorter telomers detected in this subset: analysis by flow FISH. *Hum Immunol*, 951-958

Beck AT, Ward C, Mendelson M (1961). "Beck Depression Inventory (BDI)". *Arch Gen Psychiatry*, 561-571

Bennet-Levy JY, Powell GE. (1980) The Subjective memory Questionnaire (SMQ). An investigation into the self-reporting of 'real-life memory skills'. *BrJ Soc clin Psy*, 177-88

Blasko I, Marks F, Steiner E, Hartmann T, Grubeck-Loebenstein B (1999). TNF alpha plus IFN gamma induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides, and decrease the secretion of APPs. *FASEB Journal*, 63-68

Blasko I, Veerhuis R, Stampfer-Kountchev M, Saurwein-Teissl M, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstein B (2000). Costimulatory effects of interferon-gamma and interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha on the synthesis of Abeta1-40 and Abeta1-42 by human astrocytes. *Neurobiol Dis*, 682-689

Bush AI, Martins RN, Rumble B, Moit R, Fuller S, Milward E, Currie J, Ames D, Wiedmann A, Fisher P, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL (1990). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *J Biol Chem*, 15977-15983

Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE, Greengard P (1992). Cholinergic agonists, and interleukin 1 regulate processing, and secretion of the Alzheimer β /A4 amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 10075-10078

Calderón-Garcidueñas L, Cross JV, Franco-Lira M, Aragón-Flores M, Kavanaugh M, Torres-Jardón R, Chao CK, Thompson C, Chang J, Zhu H, D'Anquilli A (2013). Brain immune interactions and air pollution: macrophage inhibitory factor (MIF), prion cellular protein (PrP(C)), Interleukin-6 (IL-6), interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra), and interleukin-2 (IL-2) in cerebrospinal fluid and MIF in serum differentiate urban children exposed to severe vs. low air pollution. *Front Neurosci*, 7:183

Calvillo M, Diaz A, Limon DI, Mayoral MA, Chánez-Cárdenas ME, Zenteno E, Montaña LF, Guevara J, Espinosa B. (2013). Amyloid-b(25-35) induces a permanent phosphorylation of HSF-1, but a transitory and inflammation-independent overexpression of Hsp-70 in C6 astrocytoma cells. *Neuropeptides*, 47:339-346

Combarros O, van Duijn CM, Hammond N, Belbin O, Arias-Vásquez A, Cortina-Borja M, Lehmann MG, Aulchenko YS, Schuur M, Kölsch H, Heun R, Wilcock GK, Brown K, Kehoe PG, Harrison R, Coto E, Alvarez V, Deloukas P, Mateo I, Gwilliam R, Morgan K, Warden DR, Smith AD, Lehmann DJ. Replication by the Epistasis Project of the interaction between the genes for IL-6 and IL-10 in the risk of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 23;6:22

Corzo L, Zas R, Rodríguez S, Fernández-Novoa L, Cacabelos R (2007). Decreased levels of serum nitric oxide in different forms of dementia. *Neuroscience Letters*, 263-267

Cotman C, Hailer N, Pfister K, Soltesz I, Schachner M (1998). Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanisms, distinct organizations?. *Progress in Neurobiology*. 55:659-669

Chong Y (1997). Effect of a carboxy-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. *Life Sci*, 2323-2333

De la Monte S, Ng S, Hsu D. (1995). Aberrant GAP-43 gene expression in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 147:934-946

De Luigi A, Pizzimenti S, Quadri P, Lucca U, Tettamanti M, Fragiaco C, De Simoni MG (2002). Peripheral inflammatory response in Alzheimer's disease and multiinfarct dementia. *Neurobiol. Dis.* 11:308-314

DeKosky ST, Scheff SW, Styren DS (1996). Structural correlates of cognition in dementia: Quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration.* 5:417-421

Deli MA, Descamps L, Dehouck MP, Cecchelli R, Joo F, Abraham CS, Torpier G (1995). Exposure of tumor necrosis factor-alpha to luminal membrane of bovine brain capillary endothelial cells cocultured with astrocytes induces a delayed increase of permeability and cytoplasmic stress fiber formation of actin. *J Neurosci Res.* 41:717-726

Delis DC (1987). California Verbal Learning Test: Adult Version Manual. San Antonio, TX. *The Psychological Corporation.*

Díaz A, De Jesús L, Mendieta L, Calvillo M, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J, Limón ID (2010). The amyloid-beta25-35 injection into the CA1 region of the neonatal rat hippocampus impairs the long-term memory because of an increase of nitric oxide. *Neurosci Lett,* 468:151-155

Díaz A, Mendieta L, Zenteno E, Guevara J, Limon ID (2011). The role of NOS in the impairment of spatial memory and damaged neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into the temporal cortex. *Pharmacol Biochem Behav,* 98:67-75

Diaz A, Limon D, Chávez R, Zenteno E, Guevara J (2012). Ab25-35 injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats. *J Alzheimers Dis,* 30:505-522

Dickson DW, Crystal HA, Marttice LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1992). Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging,* 179:189

Devenand D, Jacobs DM, Tang MX (1997). The course of psychopathologic features in mild to moderate Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry,* 257-263

- Dezan CC, Nicolau J, Souza DN, Walter LRF (2002). Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. *Archives of Oral Biology*, 423-427
- Dickson DW, Crystal HA, Marttice LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1992). Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging*. 13:179:189
- Dore S, Kar S, Quirion R (1997). Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*. 8:326-331
- Doré V, Villemagne VL, Bourgeat P, Fripp J, Acosta O, Chetelat G, Zhou L, Martins R, Ellis KA, Masters CL, Ames D, Salvado O, Rowe CC (2013). Cross-sectional and longitudinal analysis of the relationship between A β deposition, cortical thickness, and memory in cognitively unimpaired individuals and in Alzheimer disease. *JAMA Neurol*, 70:903-911
- Eisiri MM, Biddolph SC, Morris CS (1998). Prevalence of Alzheimer plaques in AIDS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 29-33
- Engelborghs S, Maertens K, Vloeberghs E, Aerts T, Somers Nore, Mariën P, De Deyn PP (2006). Neuropsychological and behavioural correlates of CSF biomarkers in dementia. *Neurochemistry International*, 48:286-295
- Engelborghs S (2013). Clinical indications for analysis of Alzheimer's disease CSF biomarkers. *Rev Neurol (Paris)*, 169(10):709-714
- Espinosa B, Guevara J, Hernández P, Slomianny MC, Guzmán A, Martínez-Cairo S, Zenteno E (2003). Characterization of a O-Glycosylated plaque-associated protein from Alzheimer disease brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 34-41
- Fleisher AS, Sun S, Taylor C, Ward CP, Gamst AC, Petersen RC, Jack CR Jr, Aisen PS, Thal LJ (2008). Volumetric MRI vs clinical predictors of Alzheimer disease in mild cognitive impairment. *Neurology*, 191-199
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. (1975) Mini-Mental State Examination: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr. Res*, 129-138

Forloni G, Demicheli F, Giorgi S, Bendotti C, Angeretti N (1992). Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1. *Brain Res Mol Brain Res*, 16:128-134

Franciosi S, Choi HB, Kim SU, McLarnon JG. (2005). IL-8 enhancement of amyloid-beta (A β 1-42)-induced expression and production of pro-inflammatory cytokines and COX-2 in cultured human microglia. *J Neuroimmunol*. 159:66-74

Friedman WJ (2001). Cytokines regulate expression of the Type 1 interleukin-1 receptor in rat hippocampal neurons and glia. *Experimental Neurology*, 23-31

Gabbita SP, Srivastava MK, Eslami P, Johnson MF, Kobritz NK, Tweedie D, Greig NH, Zemlan FP, Sharma SP, Harris-White ME (2012). Early intervention with a small molecule inhibitor for tumor necrosis factor- α prevents cognitive deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 9:99

Galimberti D, Fenoglio C, Lovati C, Venturelli E, Guidi I, Corra B, Scalabrini D, Clreici F, Mariani C, Bresolin N, Scarpini E (2005). Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*.27:1763-1768

Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW, Lott IT, Kim RC, Chui HC (1985). Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science*. 230:1179-1181

Gertz HJ, Cervos-Navarro J, Ewald V (1987). The septo-hippocampal pathway in patients suffering from senile dementia of Alzheimer's type. Evidence for neuronal plasticity? *Neuroscience Letters*. 76:228-232

Ghosh S, Wu MD, Shaftel SS, Kyrkanides S, LaFerla FM, Olschowka JA, O'Banion MK (2013). Sustained interleukin-1 β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *J Neurosci*, 33(11):5053-5064

Giordano M, Dominguez LJ, Vitrano T, Curatolo M, Ferlisi A, Di Prima A, Belvedere M, Barbagallo M. (2010). Combination of intensive cognitive rehabilitation and donepezil therapy in Alzheimer's disease (AD). *Arch Gerontol Geriatr*, 51(3):245-249

Gitter BD, Cox LM, Tydel RE, May PC (1995). Amyloid beta peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 beta-activated human astrocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 10738-10741

- Goldstein IJ (1980). What should be called lectin. *Nature*, 66-68
- Griffin WS (2013). Neuroinflammatory cytokine signaling and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 368:770-771
- Guevara J, Espinosa B, Zenteno E, Vazquez L, Luna J, Perry G, Mena R (1998). Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *JNeuropathol Exp Neuro*, 905-14
- Guevara J, Dilhuydy H, Espinosa B, Delacourte A, Quirion R, Mena R, Joannette Y, Zenteno E, Robitaille Y. (2004) Coexistence of reactive plasticity and neurodegeneration in Alzheimer diseased brains. *Histol Histopathol*. 19:1075-1084
- Hempel H Buerger K, Kohnken R, Teipel SJ, Zinkowski R, Moeller HJ, Rapoport S, Davies P (2001). Tracking of Alzheimer's disease progression with CSF tau protein phosphorylated at threonine 231. *Ann. Neurol*. 49:545-546
- Hasher L, Stoltzfus ER, Zacks RT, Rypma B (1991). Age and inhibition. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn*, 163-169
- Hattori H (2012). Role of geriatric hospitals for dementia care in the community. *Psychogeriatrics*, 12(2):124-126
- Hernández P, Bacilio M, Porrás F, Juárez S, Debray H, Zenteno E, Ortiz B (1999). A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *Hypocondriacus* lectin. *Prep Biochem Biotechnol*, 219-234
- Hodges JR, Patterson K, Oxbury S, Funnell E (1992). Semantic dementia. Progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy. *Brain*. 115:1783-1806
- Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, Riemenschneider M, De Deyn PP, Banerjee C, Cras P, Wiltfang J, Mehta PJ, Iqbal K, Pottel H, Vanderstichele H (1999). Improved discrimination of AD patients using b-amyloid₍₁₋₄₂₎ and tau levels in CSF. *Neurology* 52:1555-1562
- Huynh HK, Dorovini-Zis K (1993). Effects of interferon-gamma on primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. *Am J Pathol*. 142:1265-1278
- Jímenez M, Trejo H, Herrera A, Romero J, Chávez R, Lascurain R y Zenteno E (2002). Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Rev. Inst. Val. Enf. Resp. Mex*, 39-47

Jorn AF (1994). A short form of the Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly IQ-CODE: development and cross-validation. *Psychol Med*, 145-153

Jürgen R (1987). Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *BBA*, 405-436

Kamer AR (2010). Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurobiology*, 74:1157-1158

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987). The precursor of Alzheimer disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 733-736

Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, Kondo E, Harada M, Koseki H, Nakayama T, Tanaka Y, Taniguchi M (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 5690-5693

Kennedy KJ (1981). Perceptual and Motor Skill. 671-675

Khachaturian ZS (1985). Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*. 42:1097-1105

Kiss JZ y Muller D (2001). Contribution of the neural cell adhesion molecule to neuronal and synaptic plasticity. *Rev Neurosci*. 12:297-310

Kitazawa M, Yamasaki TR, Laferla FM (2004). Microglia as a potential bridge between the amyloid beta-peptide and tau. *Ann. N.Y. Acad Sci*, 1035:85-103

Kitazume S, Tachida Y, Oka R, Shirotani K, Saido T, Hashimoto Y (2001). Alzheimer's β -secretase, β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *PNAS*, 13554-13559

Kitazume S, Tachida Y, Oka R, Kotani N, Ogawa K, Suzuki M, Dohmae N, Takio K, Saido TC, Hashimoto Y (2003). Characterization of α 2,6-Sialyltransferase Cleavage by Alzheimer's β Secretase (BACE1). *The Journal of Biological Chemistry*, 14865-14871

Kitazume S, Suzuki M, Saido T, Hashimoto Y (2004). Involvement of proteases in glycosyltransferase secretion: Alzheimer's β -secretase-dependent cleavage and a following processing by an aminopeptidase. *Glycoconjugate Journal*, 25-29

Kitazume S, Nakagawa K, Oka R, Tachida Y, Ogawa K, Luo Y, Citron M, Shitara H, Taya C, Yonekawa H, Paulson JC, Miyoshi E, Taniguchi N, Hashimoto Y (2005). *In Vivo* Cleavage of α 2,6-Sialyltransferase by Alzheimer β -Secretase. *The Journal of Biological Chemistry*, 8589-8595

Krishnaraj R (1997). Senescence and cytokines modulate the NK cell expression. *Mech Ageing Dev*, 89-101

Lawton MP, Brody EM (1969). Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist*. 9:179-186

Lee A, Chick J, Kolarich D, Haynes P, Robertson G, Tsoli M, Jankova L, Clarke S, Packer N, Baker M (2010). Liver membrane proteome glycosylation changes in mice bearing an extra-hepatic tumour. [Epub ahead of print]

Lehnardt S, Massillon L, Follert P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8514-8519

Lezak MC. Neuropsychological assessment (Third edition). New York: Oxford University Press, 1995

Limón ID, Díaz A, Mendieta L, Chamorro G, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J (2009). Amyloid-beta (25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neurosci Res*, 63:129-137 (a)

Limón ID, Mendieta L, Díaz A, Chamorro G, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J (2009). Neuroprotective efecto of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid-beta (25-35). *Neurosci Lett*, 453:98-103 (b)

Limón ID, Ramírez E, Díaz A, Mendieta L, Mayoral MA, Espinosa B, Guevara J, Zenteno E (2011). Alteration of the sialylation pattern and memory déficits by injection of A β (25-35) into the hippocampus of rats. *Neurosci Lett*, 495:11-16

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ; Stamier JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632

- Liu J, Hu G, Xu R, Qiao Y, Wu HP, Ding X, Duan P, Tu P, Lin YJ (2013). Rhein lysinate decreases the generation of b-amyloid in the brain tissues of Alzheimer's disease model mice by inhibiting inflammatory response and oxidative stress. *J Asian Nat Prod Res*, 15(7):756-763
- Lezak M (1995). Neuropsychological Assessment. *Oxford University Press*.
- Li K, Liu S, Yao S, Wang B, Dai D, Yao L. (2009). Interaction between interleukin-8 and methylenetetrahydrofolate reductase genes modulates Alzheimer's disease risk. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 27:286-91
- Li Y, Liu L, Kang J, Sheng JG, Barger SW, Mrazek RE, Griffin WST (2000) (a). Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity, and mRNA expression. *J Neurosci*, 149-155
- Li Y, Barger SW, Liu L, Mrazek RE, Griffin WST (2000) (b). S100 β induction of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 in neurons: implications for Alzheimer pathogenesis. *Journal of Neurochemistry*, 143-150
- Limón ID, Díaz A, Mendieta L, Chamorro G, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J (2009). Amyloid-beta(25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neurosci Res*, 63:129-137
- Limón ID, Mendieta L, Díaz A, Chamorro G, Espinosa B, Zenteno E, Guevara J (2009). Neuroprotective effect of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid-beta(25-35). *Neurosci Lett*, 453:98-103
- Lindenberger U, Baltes PB (1994). Sensory functioning and intelligence in old age: a strong connection. *Psychol Aging*, 339-355
- Lis H, Sharon N (1993). Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem*, 1-27
- Liu T, Clark R, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ(1994). Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke, A Journal of Cerebral Circulation*, 1481-1488
- Lombardi VR, García M, Rey L, Cacabelos R (1999). Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and in Vitro apoptosis in healthy and Alzheimer's Disease (AD) individuals. *J. Neuroimmunol*. 97:163-171

Luterman JD, Horoutunian V, Yemul S, Ho L, Purohit D, Aisen PS, Mohs R, Pasinetti GM (2000). Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer's disease dementia. *Arch Neurol*, 1153-1160

Maccioni R, Rojo L, Fenández J, Kilji R (2009). The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's Disease. *Neuroimmunomodulation: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1153: 240–246

Mackenzie IR y Miller LA (1994). Senile plaques in temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol*, 504-510

Magaki S, Claudius M, Dickson C, Kirsch W (2007). Increased production of inflammatory cytokines in mild cognitive impairment. *Exp Gerontol.* 42:233-240

Maguire TM, Gillian AM, O'Mahony D, Coughlan MC, Dennihan A, Breen KC (1994). A decrease in serum sialyltransferase levels in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 99-102

Malinski T (2007). Nitric Oxide and Nitroxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 207-218

Masliah E, Honer WG, Mallory M, Kusher P, Hansen L, Terry R (1994). Topographical distribution of synaptic-associated proteins in the neuritic plaques of Alzheimer's disease hippocampus. *Acta Neuropathol.* 87:135-142

Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, *et al.* (2009). CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA.* 302:385-393

Mattsson N, Insel P, Nosheny R, Trojanowski JQ, Shaw LM, Jack CR Jr, Tosun D, Weiner M, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2013). Effects of cerebrospinal fluid proteins on brain atrophy rates in cognitively healthy older adults. *Neurobiol Aging*, 4589(13):372

McGeer PL, McGeer EG (2013). The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathol*, 126(4):479-497

Medeiros R, Prediger R, Passos G, Pandolfo P, Duarte F, Franco J, Dagle A, Di Giunta G, Figueiredo C, Takahashi R, Campos M, Calixto J (2007). Connecting TNF- α signaling pathways to iNOS expression in a Mouse Model of Alzheimer's

Disease: Relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by Amyloid β Protein. *The Journal of Neuroscience*, 5394-5404

Mehlhorn G, Hollborn M, Schliebs R (2000). Induction of cytotoxins in glial cells surrounding cortical beta-amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer pathology. *Int J Dev Neurosci*, 423-431

Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A (1997) S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 388:432-433

Mirra SS, Heyman A, McKell D, *et al.* (1991). The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*. 41:479-486

Moore AH, O'Banion MK (2002). Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1627-1656

Mrak RE y Griffin WST (2001). Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 903-908

Münch G, Gasic-Milenkovic J, Sukic-Stefanovic S, Kuhla B, Heinrich K, Riederer P, Huttunen H, Founds H, Sajithlal G (2003). Microglial activation induces cell death, inhibits neurite outgrowth and causes neurite retraction of differentiated neuroblastoma cells. *Exp Brain Res*, 1-8

Nicol A, Nieda M, Koezuka Y, Pecelli S, Suzuki K, Tadokoro K *et al.* (2000). Human invariant $\alpha 24+$ natural killer T cells activated by alpha galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. *Immunology*, 229-234

Nordlund A, Rolstad S, Klang O, Edman A, Hansen S, Wallin A. (2009). Two year outcome of MCI subtypes and aetiologies in the Goteborg MCI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [Epub ahead of print]

Nunomura A, Tamaoki T, Tanaka K, Motohashi N, Nakamura M, Hayashi T, Yamaguchi H, Shimohama S, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G. (2009). Intraneuronal amyloid β accumulation and oxidative damage to nucleic acids in Alzheimer disease. *Neurobiol Dis*. [Epub ahead of print]

Olso JK, Miller SD (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*. 173 :3916-3924

Osterrieth PA (1944). Le test de copie de une figure complex: Contribution a l'étude de la perception et de la mémoire. *Archives de Psychologie*, 286-356

Ostrosky-Solis F, Rodríguez Y, Chayo-Dichi R (1992). Restorative. *Neurol Neurosci*. 143

Perdivara I, Petrovich R, Allinquant B, Deterding LJ, Tomer KB, Przybyolski M (2009), Elucidation of O-glycosylation structures of the β -amyloid precursor protein by liquid chromatography - mass spectrometry using electron transfer dissociation and collision induced dissociation. *J Proteome Res*. 8:631–642

Phul RK, Shaw PJ, Ince PG, Smith ME (2000). Expression of nitric oxide synthase isoforms in spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 259-267

Pichot P, López-Ibor AJ, Valdés MM (2001). DSM-IV. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Ed. Masson. Barcelona, España. Capítulo: Delirium, demencia, trastornos amnésicos y otros trastornos cognoscitivos. Pp:129-170

Pichot P, López-Ibor AJ, Valdés MM (2001). DSM-IV. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Ed. Masson. Barcelona, España. Capítulo: Trastornos del estado de ánimo. Pp:323-399

Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Chiappelli M, Montesi F, Tumini E, Mariani E, Licastro F, Patterson C (2007). Blood inflammatory markers and risk of dementia: the study of brain aging. *Neurobiol Aging*, 1810-1820

Ripová D, Platilová V, Strunecká A, Jiráček R, Höschl C (2000). Cytosolic calcium alterations in platelets of patients with early stages of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 729-734

Rogers J, Lue LF (2001). Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid β -peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochemistri International*, 333-340

Ronn L, Berezin V, Bock E. (2000) The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int. J. Devl. Neuroscience*. 18:193-199

Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*, 2012:756357

Sada-Ovalle I, Gorocica P, Lascurain R, Zenteno E (2004). Aspectos inmunológicos del envejecimiento. *Rev Inst Enf Resp Mex*, 293-300

Saez TE, Pehar M, Vargas M, Barbeito L, Maccioni RB (2004). Astrocytic nitric oxide triggers tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons. *In vivo*, 275-280

Sáez-Valero J, Sberna G, McLean CA, Masters CL, Small DH (1997). Glycosylation of acetylcholinesterase as diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Lancet*, 929

Sala G, Galimberti G, Canevari C, Raggi ME, Isella V, Facheris M, Appollonio I, Ferrarese C (2003). Peripheral cytoline release in Alzheimer patients: correlation with disease severity. *Neurobiol. Aging*. 24:909-914

Salthouse TA, Babcock RL, Shaw RJ (1991). Effects of adult age on structural and operational capacities in working memory. *Psychol Aging*. 6:118-127

Salthouse TA (1996) (a). General and specific speed mediation of adult age differences in memory. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 51:30-42

Salthouse TA (1996) (b). The processing-speed theory of adult age differences in cognition. *Psychol Rev*. 103:403-428

Scheff SW y Price D. (1993). Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 33:190-199

Schwab C, Klegeris A, McGeer PL. (2009). Inflammation in transgenic mouse models of neurodegenerative disorders. *Biochim Biophys Acta*. [Epub ahead of print]

Serou MJ, DeCoster MA, Bazan NG (1999). Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. *J Neurosci Res*, 593-598

Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, *et al.* (2009). Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Ann Neurol*. 65:403-413

Sheng JG, Zhou XQ, Mrak RE, Friffin WST (1998). Progressive neuronal injury associated with amyloid plaque formation in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 714-717

Smith EE, Egorova S, Blacker D, Killiany RJ, Muzikansky A, Dickerson BC, Tanzi RE, Albert MS, Greenberg SM, Guttman CR (2008). Magnetic resonance imaging white matter hyperintensities and brain volume in the prediction of mild cognitive impairment and dementia. *Arch Neurol*, 94-100

Smith MA, Zhu X, Tabaton M, Liu G, McKeel DW Jr, Cohen ML, Wang X, Siedlak SL, Dwyer BE, Hayashi T, Nakamura M, Nunomura A, Perry G. (2010). Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*. 19:363-72

Song C, Zhang Y, Dong Y (2013). Acute and subacute IL-1 β administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. *J Neuroinflammation*, 10:59

Sparkman NL, Buchanan JB, Heyen JR, Chen J, Beverly JL, Johnson RW (2006). Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers. *J Neurosci*, 10709-10716

Stephan RP, Reilly CR, Witte PL (1998). Impaired ability of bone marrow stromal cells to support B-lymphopoiesis with age. *Blood*, 75-88

Stroop JR (1935). Studies of interference in serial verbal reactions. *J Exp Psychol*, 643-662

Stuling T, Maczek C, Bock G, Majdic O, Wick G (1995). Reference intervals for human peripheral blood lymphocyte subpopulations from healthy young and aged subjects. *Int Arch Allergy Immunol*, 205-210

Takeuchi A, Isober KI, Miyaishi O, Sawada M, Fan ZH, Nakashima I, Kiuchi K (1998). Microglial NO induces delayed neuronal death following acute injury in the striatum. *Eur J Neurosci*, 1613-1620

Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R *et al.* (2006). Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*, 281:21362-21368

Tarkowski E, Amdreassen N, Tarkowski A, Blennow K (2003). Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 74:1200-1205

Tenneti L, D'Emilia DM, Lipton SA (1997) Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosulation of caspases. *Neurosci Lett* 236:139-142

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, De Teresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 30:572-580

Tounsi H, Deweer B, Ergis AM (1999). Sensitivity to semantic cueing: an index of episodic memory dysfunction in early Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Rel Disord*, 38-46

Tuppo EE y Arias HR (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 289-305

Van de Pol LA, Korf ES, van der Flier WM, Brashear HR, Fox NC, Barkhof F, Scheltens P (2007). Magnetic resonance imaging predictors of cognition in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 1023-1028

Vázquez, C y Sanz, J (1997). Fiabilidad y valores normativos de la versión española del Inventario para la Depresión de Beck de 1978/Reliability and norm data of the Spanish version of the 1978 Beck Depression Inventory . *Clinica y Salud*, 403-422.

Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P (1999). Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol*, 160(1):289-299

Wang J-Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996). Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nature Med*, 871-875

Wang S, Li J, Xia W, Geng M (2007). A marine-derived acidic oligosaccharide sugar chain specifically inhibits neuronal cell injury mediated by b-amyloid-induced astrocyte activation *in vitro*. *Neurological Research*, 96-102

Wechsler D (1981). Manual para la escala de inteligencia para adultos en español. *Manual Moderno*.

Wechsler D (1987). Wechsler Memory Scale Revised Manual. San Antonio: The Psychological Corporation Harcourt Brace Jovanovich.

Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989). Identification, biogenesis and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 115-126

Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, Finke MP, Cleary JP, O'Hare E *et al.* (1998). Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS *in vivo*. *Journal of Neuroscience*, 2161-2173

Wilcock D, Lewis M, Van Nostrand W, Davis J, Previti ML, Gharkholanarehe N, Vitek MP, Colton CA (2008). Progression of Amyloid Pathology to Alzheimer's

Disease pathology in an Amyloid Precursor Protein Transgenic mouse model by removal of Nitric Oxide Synthase 2. *The Journal of Neuroscience*, 1537-1545

Wilson, Tbockburn, Baddeiey. The Riverhead Behavioral Memory Test (1985). Thames vailey Test Company, England. Traducido al Castellano como Test Conductual de Memoria Rivermead, 1991. Kaplan EF, Goodglass H, Weintraub S. The Boston Naming Test (2nd. Ed.) Philadelphia: Lea y Febiger, 1983

Wilson CJ, Finch CE, Cohen HJ (2002). Cytokines and cognition-the case for a head-to-toe inflammation paradigm. *Journal of the American Geriatric Society*, 2041-2056

Wirth M, Madison CM, Rabinovici GD, Oh H, Landau SM, Jaquist WJ (2013). Alzheimer's disease neurodegenerative biomarkers are associated with decreased cognitive function but not β -amyloid in cognitively normal older individuals.

Wisniewski KE, Wisniewki HM, Wen GY (1985). Occurrence of neuropathological changes, and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol*, 278-282

Wong A, Lüth HJ, Deuther-Conrad W, Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Arendt T, Münch G (2001). Advanced glycation endproducts co-localize with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 32-40

Zhao J, O'Connor T, Vassar R (2011). The contribution of activated astrocytes to A β production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation*, 8:150

Zelles T, Purushotham KR, Macauley SP, Oxford GE, Humphreys-Beher MG (1995). Saliva and growth factors: The fountain of youth resides in us all. *J Dent Res*, 1826-1831

ANEXO I

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Rojas K, Díaz A, Espinosa B, Montaña LF, Dilhuydy H, Geraux F, Joannette Y, Robitaille Y, Guevara J (2014). Correspondence amongst the PENO test battery cognitive results and hippocampal lesions in Alzheimer's disease. *Advances in Aging Research*; 3:239-251

ANEXO II

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Investigadores Responsables: Dr. Jorge Guevara Fonseca, M. en C. Karla Carmina Rojas Saavedra, Dra. Yaneth Rodríguez Agudelo, Psic. Mireya Chávez Oliveros y Dra. Ma. Dolores Jiménez Farfán.

Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas y *Psicología Experimental, INNN. 56063822 ext. 2010

Propósito del estudio: Identificar biomarcadores que permitan un diagnóstico temprano de la Enfermedad de Alzheimer en fases iniciales, por medio de un estudio de las células epiteliales de la mucosa bucal y muestra de sangre. El protocolo de investigación que tiene como objetivo lo anterior se titula “Análisis de correlación entre el daño cognitivo de pacientes con enfermedad de Alzheimer, expresión de interleucinas proinflamatorias y proteínas glicosiladas anormales como marcadores extra-cerebrales”.

Procedimiento: Se realizará la recolección de la mucosa bucal. El paciente recolectará saliva en la cavidad oral por un minuto, la cual será después recolectada. Este procedimiento no es invasivo y no causa dolor. No existen complicaciones al recolectar la muestra. Se obtendrá la muestra de sangre. Además, se realizarán un conjunto de pruebas de evaluación Neuropsicológica.

Confidencialidad: Los datos que se obtengan de este estudio serán estrictamente confidenciales y su uso sólo será para fines de este protocolo.

Derecho de abandonar: El o la paciente queda en absoluta libertad para abandonar el estudio en cualquier momento en que él, ella o su responsable legal lo deseen, sin que ello repercuta en la atención de su padecimiento.

Después de ser informado(a), y no tener ninguna duda al respecto de éste protocolo de investigación, autorizo la recolección de la mucosa bucal, muestra de sangre y la realización de las pruebas de evaluación neuropsicológica.

Nombre, fecha y firma del paciente o responsable legal_____

Nombre, fecha y firma del investigador responsable_____

Nombre, fecha y firma de un testigo_____

*Basado en: Normas éticas internacionales para investigaciones biomédicas con sujetos humanos. Organización Panamericana de la Salud OMS, 1996 (OPS publicaciones científicas, 563).