

00562



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**“DETERMINACIÓN DE LOS ALELOS DEL GEN DE LA
APOLIPOPROTEINA E (APOE) EN POBLACIÓN
MESTIZA MEXICANA NORMAL Y EN UN GRUPO DE
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

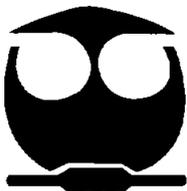
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

(BIOQUÍMICA)

P R E S E N T A:

Q.F.B. PETRA YESCAS GÓMEZ

TUTORA: DRA. MARÍA ELISA ALONSO VILATELA



m340073

MÉXICO, D.F.

2005



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: YESCA PRILA GÓMEZ

FECHA: 19 DE ENERO DEL 2005

FIRMA: 

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética y Biología Molecular del la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Bajo la dirección de la Dra. María Elisa Alonso Vilatela.

*A todos los pacientes y familiares con enfermedad de Alzheimer, por su participación y apoyo lo que nos permitió realizar éste estudio.
Agradeciendo su confianza en la búsqueda y conocimiento de tan devastadora enfermedad.*

A la memoria de mi madre

Guadalupe

*¡Porque me diste lo más maravilloso.. la vida!
Y a pesar de que ya no éstas presente, siempre estas a mí lado
porque te llevo en mi pensamiento y en mi corazón.*

Dedicatorias

A mi padre

Alberto

*Por estar siempre con nosotros, por tu ejemplo y esfuerzo que me han
dado la oportunidad de ser alguien.*

Gracias.

A mis hijos

Pedro Iván y Mixie Elizabeth

Por su tiempo, su cariño y confianza porque son mi razón de ser.

A Pedro

*Por ser mi compañero, darme su apoyo y cariño en los buenos y malos
momentos.*

A mis hermanos y sobrinos

*Enrique-Felisa, Paco-Lola, Maty, Mary-Arturo, Beto, Claudia, David, Linda,
Juan Carlos-Ruth.*

Paola, Lidya, Fanny, Lupita, Jesús

*Por su confianza y apoyo incondicional en cualquier momento, lo que me
ha permitido crecer junto con ustedes, por su cariño y respeto.*

A todos ustedes gracias.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a mis profesores y personal que labora en ella, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado, para beneficio personal y de mi país.

A los miembros del jurado Dr. José Pedraza Chaverri, Dra. María Teresa Tusié Luna, Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dra. Patricia Ostrosky Shejet, Dr. Armando Tovar Palacio, por su tiempo y comentarios en la revisión crítica de éste trabajo.

A la Dra. María Elisa Alonso Villatela, por darme la oportunidad y confianza en la realización de éste trabajo, por su apoyo incondicional en mi formación profesional y por la larga espera.

A los Drs. Camilo Ríos y Fernando Montiel, por sus revisiones tutorales y comentarios durante la elaboración de éste trabajo.

A la Dra. Leora Velásquez, Dr. Camilo Ríos y Dr. Alejandro Martínez, por su apoyo en la estadística de éste trabajo.

A Rosario, por ser mi amiga y compañera incondicional en los buenos y malos ratos que nos da la vida y la ciencia.

A Samuel, Adriana, Rosy, Rubén y Xochitl, por su amistad y apoyo compartido durante la realización de éste trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del Depto. de Genética y Biología Molecular por su participación y apoyo a éste trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida para la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.

| | Pág. |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 1 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 1 |
| RESUMEN..... | 2 |
| I. INTRODUCCIÓN | |
| 1. ANTECEDENTES..... | 5 |
| 1.1 Enfermedad de Alzheimer..... | 5 |
| 1.2 Características clínicas..... | 6 |
| 1.3 Patología de la enfermedad de Alzheimer..... | 7 |
| 1.4 Epidemiología..... | 9 |
| 1.5 Estudios de agregación familiar y gemelos..... | 9 |
| 1.2 Síndrome de Down y enfermedad de Alzheimer..... | 11 |
| 2. ETIOLOGÍA..... | 11 |
| 2.1 Gen de la proteína precursora del β - Amiloide..... | 12 |
| 2.2 Producción del péptido β -Amiloide..... | 13 |
| 2.3 Hipótesis de la cascada amiloidea..... | 14 |
| 2.4 Mutaciones en la PPA..... | 18 |
| 3. PROTEÍNA TAU..... | 21 |
| 3.1 Funciones Fisiológicas de Tau..... | 22 |
| 3.2 Alteraciones patológicas de Tau en la enfermedad de Alzheimer..... | 23 |
| 3.3 El papel de Tau en la enfermedad de Alzheimer..... | 24 |
| 4. PRESENILINAS..... | 26 |
| 4.1 Localización y estructura de las presenilinas..... | 26 |
| 4.2 Función de las presenilinas en la enfermedad de Alzheimer..... | 28 |
| 5. FACTORES GENÉTICOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER..... | 34 |
| 6. LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS..... | 35 |
| 6.1 Enzimas que intervienen en el metabolismo lipoproteico..... | 41 |
| 6.2 Receptores de lipoproteínas..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 7. APOLIPOPROTEÍNA E..... | 46 |
| 7.1 Localización cromosómica del gen ApoE..... | 46 |
| 8. ESTRUCTURA DEL GEN APOE..... | 48 |
| 9. ASOCIACIÓN ENTRE APO E Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER..... | 51 |
| 10. MECANISMO DEL GEN APO E..... | 53 |
| 11. ASOCIACIÓN DE APO E CON OTROS GENES Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER..... | 54 |
| 11.1 α -2-macroglobulina..... | 54 |
| 11.2 Enzima degradadora de insulina..... | 54 |
| 11.3 Acetilcolinesterasa..... | 55 |
| 11.4 α -1-antiquimotripsina..... | 55 |
| 11.5 Cistatina C..... | 55 |
| 12. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y OTROS FACTORES DE RIESGO..... | 57 |
| 12.1 Factores de riesgo genético..... | 57 |
| 12.2 Otros factores de riesgo..... | 59 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 62 |
| III. HIPÓTESIS..... | 62 |
| IV. OBJETIVOS..... | 63 |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 5.1. Sujetos de estudio..... | 64 |
| 5.2. Toma de muestra..... | 65 |
| 5.3. Obtención del DNA genómico..... | 65 |
| 5.3.1. Lisis de células rojas..... | 65 |
| 5.3.2. Lisis de células blancas..... | 65 |
| 5.3.3. Extracción con fenol / cloroformo..... | 66 |
| 5.3.4. Precipitación con etanol absoluto..... | 66 |
| 5.4. Extracción de ADN por precipitación con sales..... | 67 |
| 5.5. Cuantificación del DNA..... | 67 |
| 5.6. Determinación de los alelos del gen <i>Apo E</i> por PCR..... | 69 |
| 5.7. Digestión enzimática..... | 71 |
| 5.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida..... | 71 |
| 5.9. Secuenciación..... | 72 |
| 5.9.1. Purificación de productos de secuenciación..... | 73 |

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| VI. MÉTODOS ESTADÍSTICOS..... | 74 |
| VII. RESULTADOS..... | 75 |
| VIII. DISCUSIÓN..... | 88 |
| IX. CONCLUSIONES. | 92 |
| X. BIBLIOGRAFÍA..... | 93 |

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS.

| | Pág. |
|--|------|
| Fig. 1a. Placa neurítica..... | 8 |
| Fig. 1b. Marañas neurofibrilares..... | 8 |
| Fig. 1c. Neurona normal..... | 8 |
| Fig. 2. Localización cromosómica del gen <i>PPA</i> | 12 |
| Fig. 3. Sitios de procesamiento proteolítico de la <i>PPA</i> | 13 |
| Fig. 4. Vía amiloidogénica y no amiloidogénica..... | 15 |
| Fig. 5. Hipótesis de la cascada amiloidea..... | 17 |
| Fig. 6. Sitios de corte de la <i>PPA</i> | 19 |
| Fig. 7. Interacción entre Tau y EA..... | 25 |
| Fig. 8. Topología de la <i>PS1</i> | 27 |
| Fig. 9. Distribución de mutaciones en <i>PS1</i> | 30 |
| Fig. 10. Composición proteica de las lipoproteínas..... | 37 |
| Fig. 11. Transporte y metabolismo de las lipoproteínas..... | 40 |
| Fig. 12. Vías de captación de remanentes del plasma..... | 45 |
| Fig. 13. Ideograma del cromosoma 19..... | 46 |
| Fig. 14. Secuencia y sitios de mutación del gen <i>ApoE</i> | 49 |
| Fig. 15. DNA genómico en gel de agarosa..... | 68 |
| Fig. 16. Sitios de corte de la enzima de restricción <i>HhaI</i> | 69 |
| Fig. 17. Electroferogramas de los genotipos 3/3 y 4/3..... | 76 |
| Fig. 18. Electroferogramas de los genotipos 3/2 y 4/4..... | 77 |
| Fig. 19. Electroferogramas de los genotipos 4/2..... | 78 |
| Fig. 20. Gel de poliacrilamida con genotipos <i>ApoE</i> | 79 |
| Fig. 21. Distribución gráfica de los genotipos <i>ApoE</i> | 81 |
| Fig. 22. Distribución gráfica de las frecuencias alélicas..... | 83 |

ÍNDICE DE TABLAS.

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Mutaciones en el gen <i>PPA</i> | 19 |
| Tabla 2. Genes involucrados en la enfermedad de Alzheimer..... | 34 |
| Tabla 3. Apolipoproteínas de las lipoproteínas plasmáticas..... | 36 |
| Tabla 4. Composición química de las lipoproteínas..... | 37 |
| Tabla 5. Enzimas que intervienen en el transporte de lípidos..... | 42 |
| Tabla 6. Sustitución de aminoácidos en las isoformas <i>ApoE</i> | 48 |
| Tabla 7. Características de la población en estudio..... | 75 |
| Tabla 8. Frecuencias genotípicas en casos y controles..... | 80 |
| Tabla 9. Frecuencias genotípicas en casos de inicio temprano y tardío..... | 82 |
| Tabla 10. Frecuencias alélicas en casos y controles..... | 84 |
| Tabla 11. Dosis génica y sexo..... | 85 |
| Tabla 12. Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, edad de inicio número de copias del alelo $\epsilon 4$ | 87 |

RESUMEN

RESUMEN

Introducción. La causa más común de demencia es la enfermedad de Alzheimer (EA), una enfermedad degenerativa y progresiva del sistema nervioso central que produce deterioro cognitivo, de memoria, alteraciones del comportamiento, síntomas psiquiátricos y dificultad para realizar las actividades de la vida diaria, se presenta en la edad adulta. Las alteraciones neuropatológicas más importantes en la enfermedad son las placas amiloides y las marañas de neurofibrillas. Se han localizado 4 genes relacionados con el padecimiento, el gen precursor de la proteína amiloide en el cromosoma 21, el de la presenilina 1 en el cromosoma 14 y el de la presenilina 2 en el cromosoma 1, estos 3 genes son responsables de la enfermedad en algunas familias con patrón hereditario autosómico dominante. El cuarto gen se localiza en el cromosoma 19 su producto es la apolipoproteína E (ApoE). La ApoE es polimórfica y tiene 3 isoformas comunes E2, E3 y E4 que dan lugar a 6 genotipos. Se ha reportado que el alelo E4 se encuentra con mayor frecuencia en los pacientes con EA por lo cual se ha considerado un factor de riesgo genético para desarrollar el padecimiento. La EA tiene una etiología heterogénea y compleja por lo que resulta necesario establecer factores de riesgo. **Planteamiento del problema.** Debido a que la EA es la principal causa de demencia en el adulto mayor y es una patología cada vez más frecuente, han hecho que se convierta en un origen de angustia por el hecho de envejecer. Una gran parte de la patogénesis de la EA se conoce ahora gracias a las raras formas familiares de inicio temprano, sin embargo la mayoría de los pacientes desarrollan la forma no familiar donde no se han identificado mutaciones. Pero las variaciones polimórficas de otros genes al parecer influyen en la aparición de la EA, en su presentación más común, la forma tardía por lo que resulta de gran interés investigar y conocer si estas variaciones pueden ser factores de riesgo para desarrollar la EA. **Hipótesis.** De los polimorfismos existentes en el gen *ApoE*, es el alelo ϵ 4 el que aumenta el riesgo para desarrollar la EA.

Objetivo. Estudiar un grupo de pacientes con EA y controles de la población mestizo mexicana normal e investigar las frecuencias de los alelos ApoE en ambos grupos, para determinar si el alelo $\epsilon 4$ del gen de la ApoE es un factor de riesgo para desarrollar la EA.

Material y Métodos. Se estudiaron 345 individuos (161 mujeres y 184 hombres) sanos, no emparentados como grupo control y 86 casos con EA (62 mujeres y 24 hombres). A los controles mayores de 60 años se les aplicó la prueba del estado mental de Folstein la cual resultó normal. Para determinar los diferentes alelos del gen ApoE en controles como en casos con EA, se tomaron 20 ml de sangre periférica para la extracción de DNA genómico, el cual se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa empleando los oligonucleótidos que flanquean al gen ApoE. Los productos amplificados se restringieron con la enzima de restricción HhaI y fueron separados en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 8%. Se determinó el tamaño de los fragmentos comparándolos con marcadores de peso molecular conocido. Se secuenciaron los 5 genotipos más frecuentes para confirmar el cambio puntual que se produce en los nucleótidos 112 y 158.

Resultados. En el grupo control la edad promedio fue de 51 años, (rango 18-94 años), el genotipo mas frecuente fue el 3/3, sin encontrarse homocigotos para el alelo $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$. Los pacientes de acuerdo a la edad de inicio de la enfermedad se dividieron en dos grupos: los de inicio temprano (≤ 65 años) con una edad promedio de 50 años (rango 34 a 55 años) e inicio tardío (≥ 65 años) con edad promedio de 70 años (rango 65 a 85 años), en ambos grupos el genotipo 3/3 fue el mas común seguido del 3/4. Al comparar las frecuencias genotípicas entre los casos se observa una diferencia significativa en la frecuencia del genotipo 3 en los casos de inicio temprano (OR 3.032, IC 95% 1.14 a 8.08), en comparación con los casos de inicio tardío. Las frecuencias alélicas en controles y el total de casos fueron de 0.028 vs. 0.011 para el alelo $\epsilon 2$, 0.897 vs. 0.755 para $\epsilon 3$ y 0.073 vs. 0.232 para $\epsilon 4$, esta última frecuencia muestra una diferencia significativa ($p < 0.001$), con respecto a los controles. Se analizó si existían diferencias entre las diferentes formas de presentación de la enfermedad por lo que al comparar las frecuencias de alelos entre casos de

inicio temprano o tardío y controles pareados por sexo y edad, solo se observan diferencias significativas en los casos de inicio tardío ($p < 0.005$).

Se determinó que a mayor número de copias del alelo $\epsilon 4$ se incrementa el riesgo de padecer la EA y va de 5.5 para una copia a 9.5 para 2 copias del alelo $\epsilon 4$. Este riesgo es mayor en mujeres que en hombres (6.56 vs 2.76 para una copia del alelo $\epsilon 4$ y de 5.84 vs 3.85 para dos copias del alelo $\epsilon 4$), observándose también en ellas que la edad de inicio disminuye a mayor número de copias (mujeres 71.1 y 67.5 años con 1 y 2 copias del alelo $\epsilon 4$), mientras que en hombres no es tan evidente (67.5 y 70 años en hombres con 1 y 2 copias del alelo $\epsilon 4$).

Discusión. Las frecuencias genotípicas y alélicas tanto en controles como en casos son semejantes a las encontradas en otras poblaciones, sin embargo las frecuencias de los alelos $\epsilon 4$ y $\epsilon 2$ en población mestizo mexicana son bajas comparadas con otras poblaciones, pero similares a las reportadas en chinos y japoneses. La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ fue mayor en pacientes con EA de inicio tardío, por lo que puede considerarse un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad en esta muestra estudiada, estableciéndose una relación inversa entre el número de copias y la edad de inicio, siendo este más evidente en mujeres lo que sugiere una influencia por género, dando como resultado en la mujer un incremento en la susceptibilidad a la demencia.

Conclusión. El alelo $\epsilon 4$ del gen de la ApoE es un factor de riesgo para padecer la EA de inicio tardío, siendo éste mayor en mujeres, pero no es necesario, ni suficiente para causarla.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 ANTECEDENTES.

El desarrollo económico, social y científico de los últimas décadas, ha permitido la disminución de la mortalidad, el mejoramiento en la calidad de vida y como resultado un aumento en la esperanza de vida. Por lo tanto las enfermedades propias del envejecimiento se han incrementado como es el caso de las demencias, las cuales son un importante problema de salud entre los adultos mayores y son cada vez más frecuentes conforme avanza la edad.

La detección de afectados al inicio de la enfermedad es difícil en muchas ocasiones, el deterioro en la capacidad cognoscitiva es erróneamente considerado normal a causa de la edad, sin embargo cuando el deterioro cognoscitivo aumenta y disminuye en forma alarmante la posibilidad de una vida independiente, es necesario pensar en una demencia (Rocca y cols., 1986; Bachman y cols., 1993).

La demencia es un síndrome complejo que puede ser causado por más de 60 padecimientos, sin embargo se considera que el 60% de los casos corresponden a la enfermedad de Alzheimer (EA), 20% a demencia vascular y el 20% restante a diversas enfermedades que incluyen padecimientos metabólicos, infecciosos, tóxicos, hereditarios, etc. (Alonso y cols., 1998; Bachman y cols., 1993).

I.2 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La EA es un padecimiento degenerativo del sistema nervioso central (SNC), que se caracteriza por la pérdida de memoria y deterioro de las funciones cognoscitivas; fue descrito en 1907 por Alois Alzheimer y los criterios para realizar el diagnóstico de EA fueron establecidos por McKhann y cols., en 1984. En ellos se refiere que para un diagnóstico definitivo de la enfermedad se requiere de la evidencia histopatológica obtenida por biopsia o autopsia.

1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza como un síndrome con múltiples variantes patogénicas, sin embargo las principales características clínicas son:

Alteraciones de la memoria, que constituyen el aspecto clínico predominante y son las primeras manifestaciones que se presentan, ya que olvidan información nueva o sucesos recientes, ésta se va haciendo más notoria y progresa conforme avanza el padecimiento (Cummings y cols., 2002).

Afasia: que corresponden a alteraciones del lenguaje tanto en su comprensión (lenguaje hablado y escrito) como en su emisión, puede haber repetición de lo que oye por medio de sonidos o palabras una y otra vez. En estadios avanzados los pacientes pueden enmudecer por la dificultad generada por la pérdida de vocabulario, ocasionalmente repitiendo sólo las sílabas finales de una palabra (Alberca y cols., 1998).

Apraxias: se refieren al deterioro de la capacidad de ejecución de actividades motoras, se pierde la habilidad del uso de objetos para realizar una tarea, así como la actividad constructiva de actos motores conocidos, por ejemplo el movimiento de las manos para saludar, decir adiós, peinarse, cepillarse los dientes, etc. (Cummings y cols., 2002).

Agnosias: la incapacidad de reconocerse a si mismo y/o a sus familiares, así como identificar objetos, a pesar de tener una función sensorial y visual intacta.

Alteraciones en la capacidad de ejecución: implica el deterioro del pensamiento abstracto, para planificar, iniciar, secuenciar, monitorizar y detener un comportamiento complejo. El paciente es incapaz de encontrar diferencias entre dos objetos, también se puede manifestar por la incapacidad de afrontar situaciones nuevas ya que requieren del procesamiento de información nueva y compleja, lo que le impide realizar actividades de la vida diaria como bañarse, vestirse, el uso del sanitario, etc. (Pérez-Tur, 2000).

En etapas finales o más tardías, el deterioro cognoscitivo progresa y se acompaña de ansiedad, depresión, trastornos del sueño, alucinaciones y en algunos casos pueda presentarse crisis convulsivas (Pérez-Tur, 2000, 2001).

I.4 PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Los hallazgos más importantes en el cerebro de los pacientes con EA son la atrofia cerebral, la pérdida de neuronas, presencia de marañas neurofibrilares y placas neuríticas, también se puede observar degeneración granulovacuolar y cuerpos de Hirano principalmente en neuronas piramidales del hipocampo (Katzman, 1986; Mena y García, 1998).

Los criterios anatomopatológicos para el diagnóstico de EA fueron establecidos por Kachaturian en 1985 y se basan en las dos principales lesiones localizadas en hipocampo y corteza cerebral:

Placas neuríticas: están compuestas de racimos de terminaciones nerviosas degeneradas tanto dendríticas como axonales unidas a un corazón (core) que contiene filamentos lineales ordenados extracelularmente que corresponden a la proteína β -amiloide. Este péptido formado de 42 a 43 aminoácidos (a.a.), es insoluble, es el mayor y principal componente de la placa que se deposita en el cerebro de estos pacientes (Fig. 1a).

Marañas neurofibrilares: se localizan intraneuronalmente, ya que corresponden a neuronas anormales cuyo citoplasma está lleno de estructuras filamentosas globulares (Fig. 1b). Están compuestas de filamentos apareados o entrelazados en forma helicoidal y de microtúbulos los cuales precipitan en el interior de la célula causándole la muerte (Nee y cols., 1993).

El principal componente de los filamentos es la proteína Tau que está anormalmente fosforilada, por ser una proteína del citoesqueleto de unión a microtúbulos, al alterarse su función normal, conduce a la desorganización de los mismos y altera el transporte axonal, dando lugar a la formación de las

marañas neurofibrilares, a diferencia de la estructura normal de la neurona como se muestra en 1c (Selkoe, 1991).

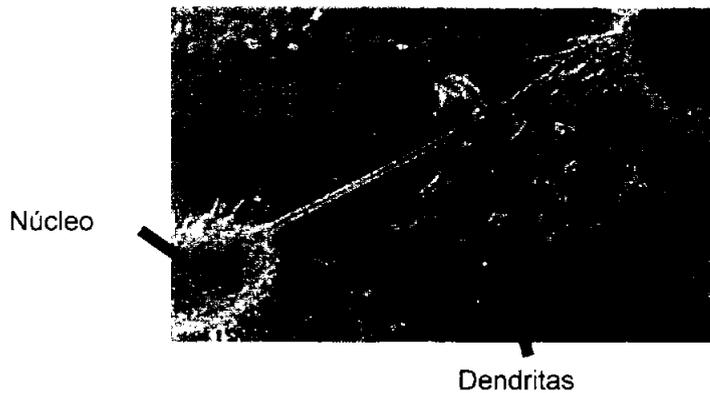
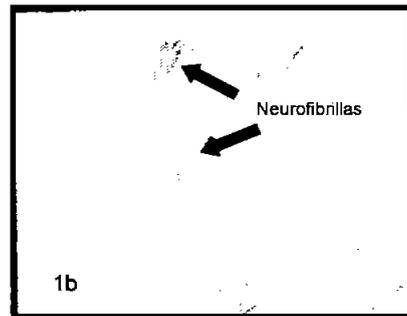
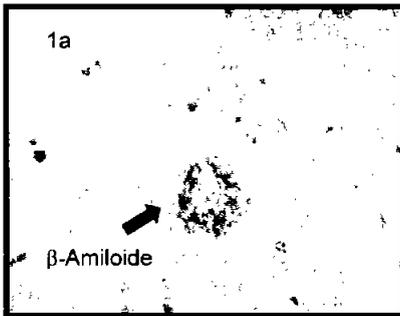


Fig. 1a. Se muestra en un corte de tejido cerebral la presencia de una placa neurítica, mientras que la Fig. 1b muestra las marañas neurofibrilares. En la Fig. 1c se muestra tejido normal donde se observa la arquitectura íntegra de las neuronas con su núcleo, axón y dendritas, así como la comunicación entre ellas, mientras que en los pacientes con EA se pierden estas estructuras generándose las lesiones mostradas en a y b.

1.5 EPIDEMIOLOGÍA.

Existen diferentes estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia de la enfermedad, la cual varía de 1.9 a 11% en población mayor de 65 años. Evans y cols., (1989), encontraron una prevalencia mucho mayor (47%) en población entre 75 a 84 años.

La prevalencia entre los individuos de 85 años o más varía según los diferentes estudios entre 20 a 50%, siendo mayor su frecuencia entre las personas que se encuentran hospitalizadas o son residentes de alguna institución (Bachman y cols., 1993; Katzman y cols., 1986). Algunos investigadores han encontrado que la prevalencia se duplica cada 5 años entre las edades de 65 y 85 años (Wernicke y cols., 1994).

En México no tenemos investigaciones epidemiológicas que nos permitan conocer la prevalencia de la enfermedad. En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se revisaron 6258 expedientes y se encontró diagnóstico de EA en 0.2% de ellos (Alonso y cols., 1989).

1.6 ESTUDIOS DE AGREGACIÓN FAMILIAR Y GEMELOS.

La presencia del factor hereditario en la EA fue mencionado por primera vez en 1930 en la Reunión de Psiquiatría de Baviera, en 1932 Schottky describió la EA en un padre y su hija y en 1933 Gillespie presentó un informe sobre la aparición familiar de la EA en la Real Sociedad de Medicina en Londres (Zerbin-Rudin, 1969).

Sjögren y cols., (1952), realizaron el primer estudio formal de agregación familiar. Desde entonces diversos estudios han demostrado que la demencia es frecuente entre los parientes de los pacientes, por ejemplo, Heston y cols. (1981), encontraron que de 125 casos con EA con diagnóstico confirmado por autopsia, 40% tenían antecedentes familiares de demencia.

Chui y cols., (1985), estudiaron 146 pacientes y observaron un 44.8% con antecedentes familiares de demencia y ese mismo año Mayeux y cols., vieron a 121 enfermos de los cuales 37.2% tenían historia familiar de demencia.

Algunas familias con historia familiar positiva, muestran un patrón de herencia autosómico dominante (AD) (Bird y cols., 1989; Bruni y cols., 1992; Goudsmit y cols., 1981; Gómez y cols., 1986; Nee y cols., 1993) y en algunos de ellos se ha observado que la edad de inicio es más temprana (<65 años), por ejemplo en los casos informados por Alonso y cols. (1992), la edad de inicio promedio fue de 42.7 años, con rango de 38 a 47 años. Las familias con herencia AD comprenden del 5 a 10% de todos los casos con EA.

Los casos familiares en los que no puede establecerse un patrón hereditario definido pueden corresponder a herencia multifactorial, o bien a casos con herencia AD dependiente de la edad, en los que el patrón hereditario queda enmascarado debido a que algunos individuos portadores del gen fallecen por diferentes causas antes de llegar a la edad en que se manifieste la enfermedad (Alonso y cols., 1998).

Bird y cols. (1988), describieron un grupo de 5 familias con herencia AD, 3 de ellas publicadas anteriormente que descendían de un grupo cultural conocido como los germanos del Volga, que eran emigrantes rusos que se instalaron en el sur de las orillas del Volga, a fines del siglo XIX, después de la Primera Guerra Mundial varios individuos de este grupo emigraron a EU. En algunas familias de este grupo la EA se transmitía por varias generaciones, aunque no encontraron en ellos un antepasado común es muy probable que se observe en este grupo el efecto del fundador.

Los estudios de gemelos se han realizado también para determinar la influencia del factor genético en la EA, sin embargo estas investigaciones son escasas, debido al inicio tardío de la enfermedad y a que es difícil mantener un seguimiento a largo plazo.

Sin embargo se ha encontrado una concordancia de 40 a 50% en gemelos idénticos en comparación con 10-50% en dicigóticos (Pericak-Vance y cols., 1995).

1.7 SÍNDROME DE DOWN Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Desde hace tiempo se encontró que los cerebros de pacientes con síndrome de Down mostraban las mismas alteraciones anatomopatológicas observadas en los pacientes con EA (Lai y cols., 1989; Millichap y cols., 2003).

Wisniewski y cols. (1985), analizaron 100 cerebros de pacientes con síndrome de Down encontrando en todos los cerebros de los pacientes que sobrevivieron 40 años o más, placas seniles y marañas de neurofibrillas similar a lo reportado en los pacientes con EA (Glennner y cols., 1984a).

2. ETIOLOGÍA.

La etiología de la enfermedad de Alzheimer se desconoce, se han establecido causas genéticas y ambientales que conducen a la demencia y desde hace varios años se inició la búsqueda de los genes responsables de producir EA en familias con herencia AD.

Los primeros estudios de ligamiento a marcadores genéticos convencionales dieron resultados negativos o contradictorios y fue realmente a finales de la década de 1980 con el empleo de marcadores genéticos moleculares y estudios de ligamiento que se logró establecer la relación entre un marcador y el posible gen responsable (Lendon y cols., 1997; Ray y cols., 1998; Spence y cols., 1986; Weitkamp y cols., 1983.).

2.1 GEN DE LA PROTEÍNA PRECURSORA DEL β -AMILOIDE.

Las primeras investigaciones se iniciaron en 1987 por St George-Hyslop, en el cromosoma 21, reportándose ligamiento a marcadores genéticos en el cromosoma 21q11.2-21q22.2, sin embargo estudios posteriores no confirmaron la existencia de un locus en esa región.

Se buscó una relación con el cromosoma 21, debido a que en los cerebros de pacientes con síndrome de Down que fallecen después de los 40 años, se encontraron las mismas lesiones que en los pacientes con EA, lo que permitió asociar la enfermedad a este cromosoma.

En el mismo año se localizó y aisló el gen que codifica para la **Proteína Precursora Del β -Amiloide (PPA)** en el cromosoma 21q21.1 (Goldgaber y cols., 1987, Fig. 2).

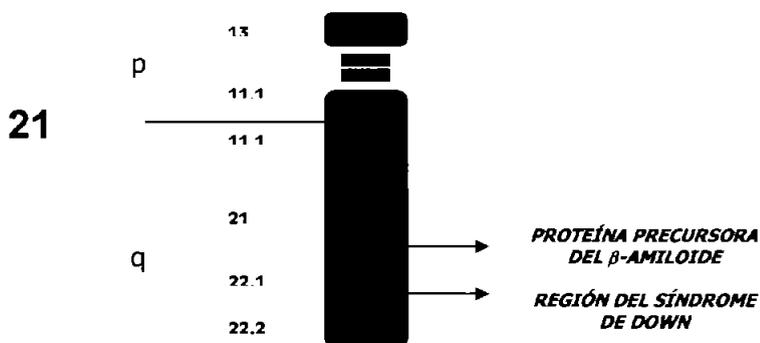


Fig. 2. Localización cromosómica de los genes relacionados a la *proteína precursora del β -amiloide* y el síndrome de Down.

2.2 PRODUCCIÓN DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE.

El amiloide que se deposita en los vasos sanguíneos y placas amiloides de los pacientes con EA es un péptido de 39 a 43 aminoácidos llamado β -amiloide (β A), fue purificado por Glenner y Wong (1984b), la secuencia de este péptido está cercana al carboxilo terminal de las isoformas de PPA, así el péptido β A es un fragmento proteolítico de la degradación de una proteína mucho mayor, la cual existe en diversas isoformas (Holtzman y cols., 1991).

El gen *PPA* tiene 18 exones, presenta procesamiento alternativo (splicing) que da lugar a 3 isoformas comunes de 695, 775 y 777 aminoácidos respectivamente, al menos 2 isoformas contienen un dominio con función de inhibición de proteasas (Chartir-Harlin y cols., 1991a; Hardy y cols., 2002; Fig. 3).

SITIO ALTERNATIVO DE SPLICING
EXONES AUSENTES EN APP695

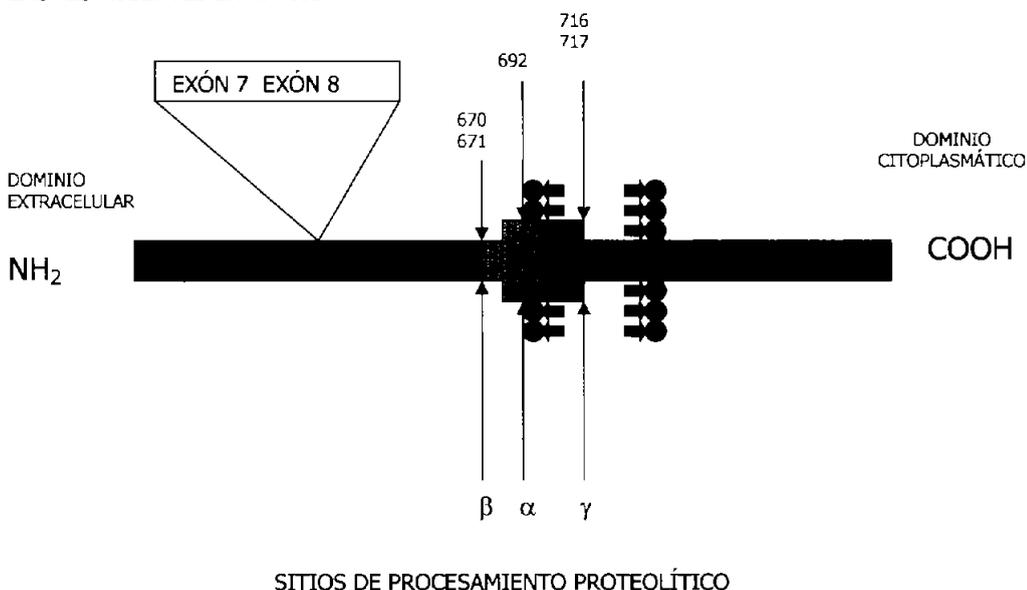


Fig. 3. Se muestran los diferentes sitios proteolíticos y de mutación en la proteína precursora del amiloide.

2.3 HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDEA.

El gen PPA se expresa en diferentes tejidos incluyendo a las neuronas, la función biológica de la proteína no se entiende completamente, se ha encontrado que puede intervenir en la inhibición de proteasas, adhesión celular y tiene características estructurales de las proteínas de membrana (Goldgaber y cols., 1987).

Se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso y es glicosilada al pasar por el aparato de Golgi donde se empaqueta en vesículas de transporte que viajan al citoplasma para finalmente instalarse en la membrana celular donde puede seguir dos vías metabólicas (Alberca y cols., 1998; Vassar y cols., 1999) como se muestra en la Fig. 4.

La liberación del β A se da por acción de diversas proteasas que compiten por la misma región de la proteína, siendo más común la **vía no amiloidogénica o no amiloidea**, que por acción de una α -secretasa corta a la PPA produciendo un fragmento amino-terminal largo y soluble (PPA_{ca}) y un fragmento carboxilo terminal de 10 kd llamado C83 el cual permanece unido a la membrana y por acción de una γ -secretasa produce un péptido no tóxico, soluble de 3 kd (p3).

En la **vía amiloidogénica o amiloidea**, la acción es realizada por una β -secretasa, que al cortar la proteína PPA libera un fragmento amino-terminal soluble de 100 kd (PPA_{ba}) y un fragmento carboxilo terminal de 12 kd llamado C99, que también queda unido a la membrana y que al ser cortado por la γ -secretasa libera al péptido β A maduro de 4 kd. (Alberca y cols., 1998; Vassar y cols., 1999).

Siendo más común la forma soluble de 40 a.a., mientras que sólo un 10% es de 42 a 43 a.a., la sobreproducción de este último permite que se acumule en el cerebro de los pacientes, ya que este péptido es menos soluble y forma agregados fibrilares insolubles que se localizan en los depósitos amiloides teniendo un efecto neurotóxico sobre las neuronas (Esler y cols., 2001).

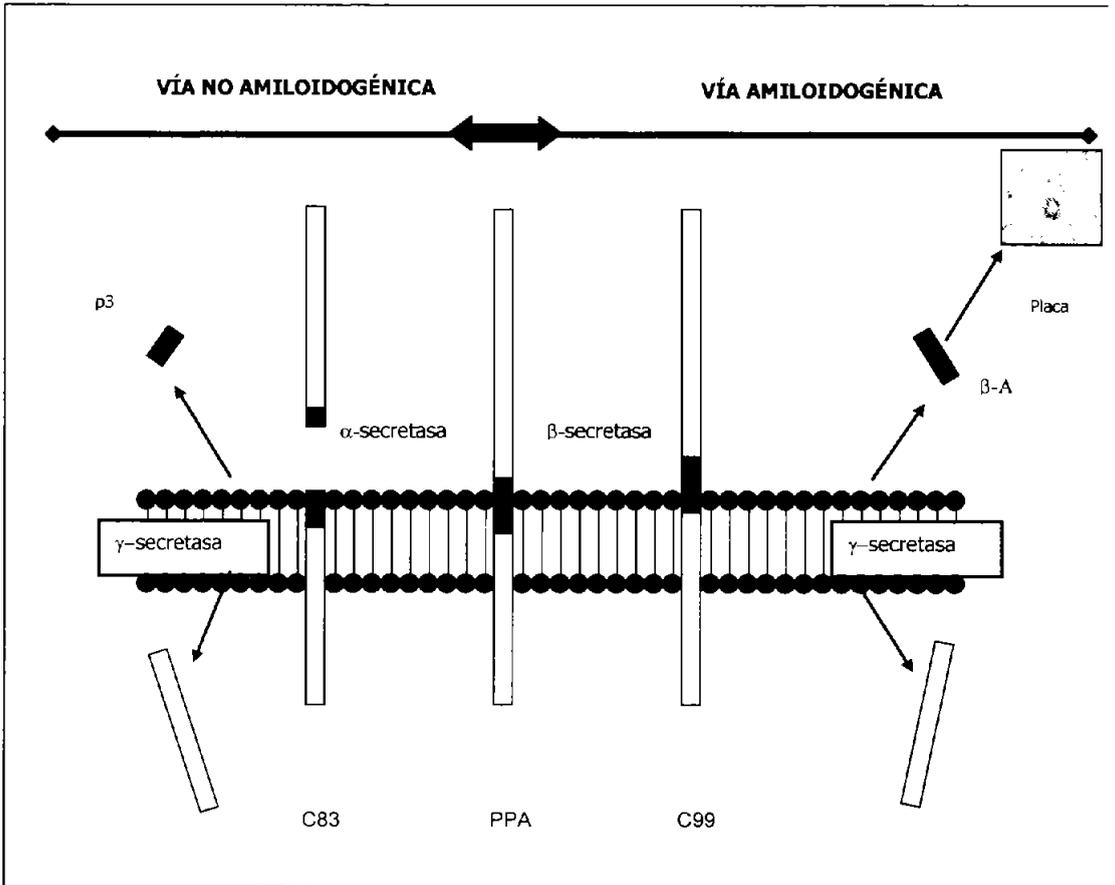


Fig. 4. Se muestra que en la vía no amiloidogénica el corte por α -secretasa resulta en la eliminación del PPA secretada y concluye con la formación intacta del β -amiloide, mientras que en la vía amiloidogénica la acción de β y γ -secretasas resultan en la eliminación del péptido intacto de β -A-40 ó β -A-42 a 43 a.a.

Estos depósitos al ser tóxicos para la neurona desencadenan una serie de reacciones entre las que se incluye la hiperfosforilación de la proteína Tau que asociada a microtúbulos forma filamentos helicoidales apareados que dan origen a las marañas neurofibrilares.

La elevación del calcio intracelular alcanza niveles letales para la neurona, se activan la formación de radicales libres, el estrés oxidativo y los procesos de apoptosis que llevan a la muerte neuronal, constituyen la hipótesis de la cascada amiloidea (Hardy y cols., 2002; Smith y cols., 2002; Tandon y cols. 2000, Fig. 5).

El mecanismo por el cual el β -amiloide daña a las neuronas, no se conoce con certeza. Existen evidencias del proceso inflamatorio en respuesta al daño neuronal, que a su vez está vinculado a una gran variedad de procesos antes mencionados que conducen a la muerte neuronal en regiones específicas del cerebro entre las que se incluye hipocampo y la corteza cerebral (Holtzman y cols., 1991; St George-Hyslop, 2000).

Esta hipótesis es la más aceptada hasta el momento, sin embargo no explica los mecanismos que producen el aumento en la producción del β -amiloide y como se llega a la muerte neuronal. Sin embargo esta hipótesis postula el hecho de que las placas seniles son las primeras lesiones que aparecen en la enfermedad y apoya esta hipótesis el hecho de que hay mutaciones en los genes que codifican para la *PPA*, *PS1* y *PS2*, producen un incremento en la producción del β -amiloide de 42 a.a. y la formación de placas (Tandon y cols., 2000).

HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDEA

Mutaciones puntuales en los genes *PPA*, *PS1*, *PS2*



Acumulación y aumento en la producción del β -amiloide de 42 a.a.



Formación de placas seniles



Efecto sobre la sinapsis



Respuesta inflamatoria: activación de la microglía y liberación de citocinas, astrocitosis, liberación de proteínas de fase aguda



Lesión neurítica progresiva en las placas amiloides → daño oxidativo
Alteración en la homeostasis metabólica neuronal



Alteración de actividades cinasas/fosfatasa, hiperfosforilación de Tau, formación de marañas neurofibrilares



Disfunción y muerte neuronal generalizada en hipocampo y corteza

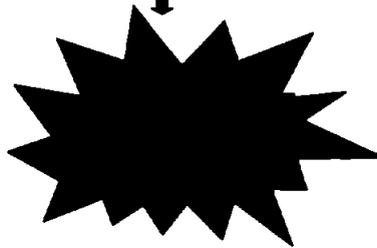


Fig. 5. Hipótesis de la cascada amiloidea, proteína precursora del amiloide (*PPA*) y las presenilinas 1 y 2 (*PS1*, *PS2*) (tomada y adaptada de Hardy y cols., 2002).

2.4 MUTACIONES EN EL GEN PPA.

En 1991 Goate y cols., encontraron en 2 familias con EA de inicio temprano, mutaciones en el gen *PPA* que cosegregaban con la EA y producen una sustitución en posición 717 de valina por isoleucina cercana al carboxilo terminal del péptido β -amiloide (Chartier-Harlin y cols., 1991a).

Se han identificado 6 mutaciones patogénicas en el gen *PPA* para EA de inicio temprano (Tabla 1), 3 están en el codón 717 (el número de codones se basa en la isoforma de 770 a.a. de la *PPA*), que normalmente codifica para valina y en estas mutaciones hay sustitución por isoleucina 717, fenilalanina 717 y glicina 717, las 3 sustituciones se encuentran 3 a.a. pasado el extremo carboxilo terminal (Chartier-Harlin y cols., 1991a, b).

Se ha reportado una doble mutación en algunas familias que resulta en una sustitución de lisina por asparagina y metionina por leucina en los codones 670 y 671 respectivamente. Estos codones están inmediatamente antes de la secuencia de inicio en la región amino terminal del péptido β A. En la Fig. 6 se indican los sitios de las principales mutaciones de *PPA* (Goate y cols., 1991; Murrell y cols., 1991; Nussbaum y cols., 2003).

No se conoce todavía la forma por medio de la cual actúan estas mutaciones que flanquean o están dentro de la secuencia del péptido β A en la patogénesis de la EA, sin embargo alteran los eventos proteolíticos, así como el tamaño del péptido que se produce (Lannfelt y cols., 1995; Nussbaum y cols., 2003).

Tabla 1. – Mutaciones más frecuentes en la PPA asociadas con enfermedad de Alzheimer.

| Exón | Codón | Mutación | Nº de Familias |
|------|---------|----------|----------------|
| 16 | 670/671 | KM→NL | 1 |
| 17 | 692 | A→G | 1 |
| 17 | 716 | I→V | 1 |
| 17 | 717 | V→I | 16 |
| 17 | 717 | V→G | 1 |
| 17 | 717 | V→F | 1 |

- A-Alanina
- F-Fenilalanina
- G-Glicina
- I-Isoleucina
- K-Lisina
- L-Leucina
- M-Metionina
- N-Asparagina
- V-Valina

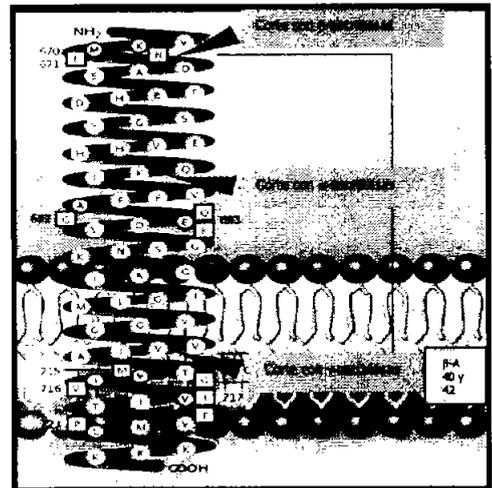


Fig. 6. Se muestran los diferentes sitios de corte que realizan las diferentes secretasas y los principales sitios de mutaciones en la PPA (tomada y modificada de Nussbaum y cols., 2003).

Experimentalmente, se ha demostrado que utilizando líneas celulares transfectadas con construcciones que expresan secuencias de DNA complementario (cDNA) con la mutación asparagina 670/leucina 671 (Asn 670/Leu/671), se libera de 5 a 8 veces más péptido β A, comparado con lo que se produce con la secuencia silvestre (Cai y cols., 1993).

Cultivos de fibroblastos de individuos que llevan esta mutación Asn 670/Leu/671, secretan 3 veces más β A que los fibroblastos normales y esto puede observarse tanto en células de individuos sintomáticos como en portadores presintomáticos (Citron y cols., 1994).

Los diferentes trabajos sugieren que las mutaciones en la PPA pueden causar EA, por un incremento en la producción del péptido β A debido presumiblemente a una mayor susceptibilidad de los sitios de corte proteolítico.

La identificación de las proteasas que eliminan el β A de la PPA y las proteasas que cortan los sitios internos del β A son críticos para determinar como estas mutaciones conducen a la enfermedad como se muestra en las (Figs. 5 y 6).

Se ha observado también que los mutantes *APP 717* producen más rápidamente, no sólo un aumento del péptido β A secretado, sino que éste sea más largo y forme fibrillas amiloides insolubles (Suzuki y cols., 1994).

Estos trabajos sugieren que estas mutaciones causan EA por aumento en la producción del péptido $A\beta$; en apoyo a la hipótesis amiloidea está la producción de un ratón transgénico que lleva como promotor al factor de crecimiento derivado de plaquetas, para expresar el gen de la PPA con la mutación Val717Fen (Games y cols., 1995).

Estos animales desarrollan depósitos $A\beta$ amiloides, placas neuríticas, pérdida de sinapsis, astrocitosis, microgliosis y producen mayores cantidades del péptido $A\beta$.

Las mutaciones en el gen *PPA* son raras, se observan en un número muy reducido de familias (-1%) con herencia autosómica dominante (AD) e inicio temprano, lo cual ha sugerido heterogeneidad genética (St George-Hyslop, 2000).

3. PROTEÍNA TAU.

Otra explicación de la patología de la EA son las alteraciones de la proteína Tau, la cual forma filamentos apareados que se entrelazan en forma helicoidal, los cuales se precipitan en el interior de la célula y forman los ovillos o madejas neurofibrilares característicos de la EA (Pérez-Tur, 2001).

Los depósitos de Tau ocurren en neuritas distróficas como finos hilos neurofílicos o como marañas neurofibrilares masivas en el cuerpo de la célula neuronal, los cuales se ven como fantasmas extracelulares después de la muerte de la neurona (Sánchez y cols., 2001).

El primer signo en una neurona afectada es una fosforilación anormal de Tau, seguida de agregación, lo que conduce a la pérdida de la sinapsis y deficiencia en el transporte neuronal.

La formación de las madejas neurofibrilares son debidas a que Tau que normalmente esta fosforilada sufre una hiperfosforilación que impide su función normal de autoagregación en fibrillas y su unión a la tubulina que forma los microtúbulos, al no cumplir con esta función lleva a la desorganización de los microtúbulos y más tarde a la muerte neuronal.

Las mutaciones en la proteína Tau se asocian a otro tipo de demencia (demencia frontotemporal con parkinsonismo), las cuales muestran pronunciados depósitos de Tau y se les conoce como "Tautopatías" (Mirra y cols., 1999; Sánchez y cols., 2001).

3.1 FUNCIONES DE TAU.

El gen de la proteína Tau se localiza en el cromosoma 17, es una de las principales proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), presente en las neuronas cuya función es la producción, ensamblaje y estabilidad de los microtúbulos del citoesqueleto axonal por donde circulan nutrientes y diversas moléculas intracelulares, así como establecer la polaridad celular y el transporte intracelular (Wilhelmsen, 1997).

Tau se produce principalmente en axones, el gen que codifica para Tau da lugar a seis isoformas de 352 a 441 a.a. (por splicing alternativo) en el sistema nervioso central, más una variante mayor en nervios periféricos (Spillantini y cols., 1997; Murrell y cols., 1997).

Tau contiene un dominio amino terminal (N-terminal) ácido y uno básico (que contiene 3 o 4 repetidos internos), un dominio medio rico en proínas y un dominio carboxilo terminal (C-terminal). Por lo que Tau es muy hidrofílica, soluble y muestra una estructura nativa desplegada que le permite ser fosforilada en múltiples sitios, algunos de los cuales regulan las propiedades de unión a microtúbulos.

Estos sitios están subdivididos en 2 clases: motivos Ser-Pro o motivos Thr-Pro presentes en ambas regiones, flanqueando los repetidos internos y son blanco de cinasas como la GSK 3 (cinasa-3-glutaminasintetasa), Cdk5 (cinasa dependiente de cíclicas) o MAP cinasas.

La fosforilación de Tau se relaciona con MAPs por MARK (cinasas que regulan la afinidad a microtúbulos) que son importantes para establecer la polaridad celular, por lo que la sobre actividad de MARK conduce a la muerte celular.

Tau es necesaria para el crecimiento fuera de las neuritas, los axones muestran un gradiente de concentración de Tau, con un máximo próximo a la punta y un gradiente de fosforilación de Tau alto, proximal al axón. Sin embargo ratones transgénicos carentes de Tau no muestran defectos mayores,

posiblemente porque otras MAPs pueden sustituir a Tau (Goedert, 1989; Wilhelmsen y cols., 1997).

3.2 ALTERACIONES PATOLÓGICAS DE TAU EN LA EA.

En la EA las propiedades de Tau cambian en diferentes etapas:

- a) Tau en la EA muestra una hiperfosforilación anormal en muchos sitios. Algunos incrementos ocurren en tejido fetal y en células mitóticas, conduciendo la hipótesis de que las señales "mitóticas" recibidas por neuronas diferenciadas pueden causar la hiperfosforilación de Tau y posteriormente la muerte por apoptosis.
- b) Tau en la EA, muestra la pérdida de unión a microtúbulos probablemente como consecuencia de la hiperfosforilación en sitios que separan Tau de microtúbulos y llevándolos al desapareamiento y como consecuencia al rompimiento del tráfico intracelular que resulta en axones agonizantes.
- c) La redistribución de Tau a partir del axón a un modelo somatodendrítico, sugiere que en la EA se debe a un defecto en la orientación de Tau dentro de los compartimentos correctos. Por lo que al incrementarse los niveles de mRNA y la síntesis de Tau, hay una sobre expresión en la célula y una perturbación en los mecanismos de distribución.
- d) La agregación de Tau es particularmente inexplicable, considerando su extraordinaria solubilidad. Los agregados son llamados "filamentos helicoidales apareados" (FHAs) porque tienen la apariencia de dos cadenas con una amplitud de 10 a 20 nm y repetidos entrecruzados de 80 nm. *In vitro*, el ensamble de los FHAs es ineficiente, pero puede incrementarse por oxidación que conduce a la polimerización de Tau, y por la interacción con polianiones tales como la heparina o el RNA.

- e) La ubiquitinación y la proteólisis son modificaciones postraduccionales de Tau-EA que probablemente representan intentos celulares para degradar proteínas aberrantes (vía proteasoma o calpaina). Sin embargo, algunos fragmentos proteolíticos son detectados en estadios tempranos y esto puede contribuir a la nucleación de FHAs.
- f) Un incremento de Tau en líquido cefalorraquídeo (~200 pg/ml a 600 pg/ml) probablemente puede producir neuronas agonizantes. Esta característica puede ser valiosa en ensayos de diagnóstico temprano (Andreadis y cols., 1992; Goedert y cols., 1989; Wilhelmsen y cols., 1997).

3.3 EL PAPEL DE TAU EN LA EA.

Las interacciones entre transporte axonal, microtúbulos y Tau en la EA pueden esquematizarse hipotéticamente en la Fig. 7.

Las señales inapropiadas conducen a un desbalance de cinasas/fosfatasa, hiperfosforilación de Tau (independientemente de microtúbulos), rompimiento de microtúbulos, agregación de Tau dentro de FHAs, falla del transporte intracelular y degeneración de neuronas.

Sin embargo, muchos pasos intermedios no son conocidos y no se ha podido tener un modelo celular que permita examinar *in vitro* las diferentes cinasas, y la sobre expresión de isoformas de Tau humana en ratones transgénicos, no han resultado en una patología similar a la EA.

Las demencias asociadas con mutaciones en Tau son distintas a la EA, ya que afectan diferentes regiones en el cerebro. Sin embargo puede haber un vínculo común entre las "Tautopatias", que ayude a entender la pérdida neuronal en la EA (Mandelkow y cols., 1998; Sánchez y cols., 2001; Spillantini y cols., 1997).

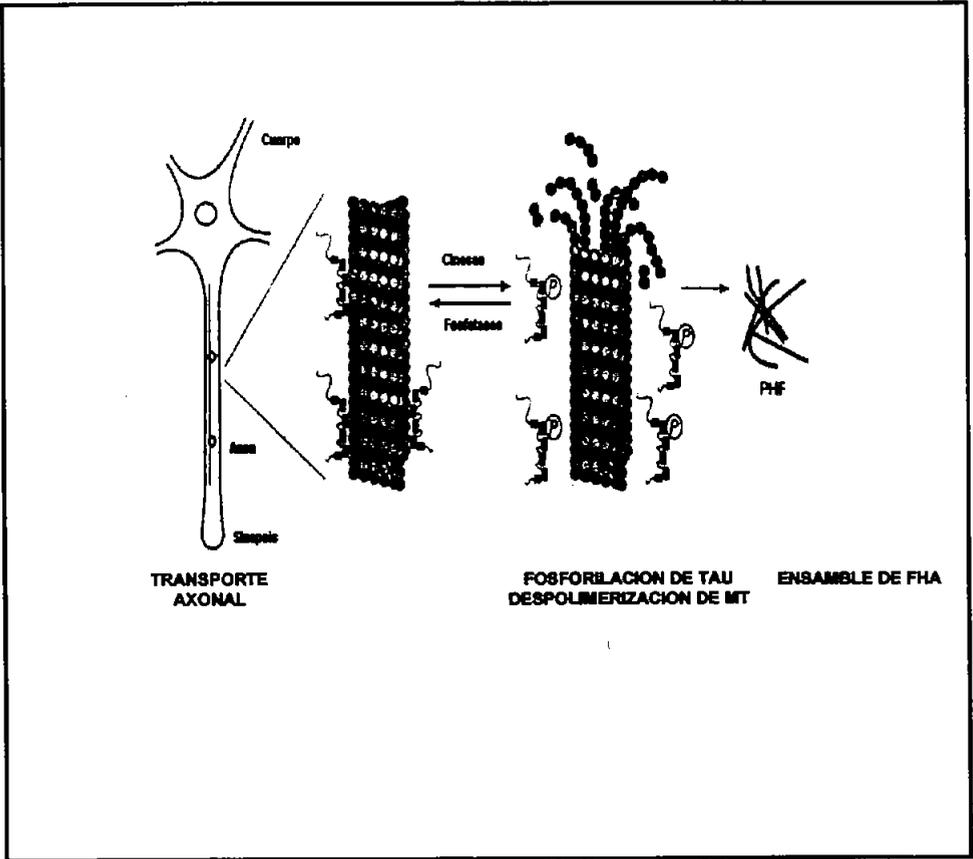


Fig. 7. Modelo que muestra la posible interacción entre el transporte axonal, microtúbulos y Tau en la Enfermedad de Alzheimer. El transporte en los microtúbulos está estabilizado por la proteína Tau y la fosforilación (P) en sitios cruciales apartan a Tau de los microtúbulos y esto lleva al rompimiento de los microtúbulos y la acumulación de agregados de Tau dentro de filamentos helicoidales apareados (FHA), tomada y modificada de Mandelkow y Mandelkow (1998).

4. PRESENILINAS.

Las mutaciones en el gen de la Proteína Precursora del β -amiloide son raras y corresponden entre un 5 a 10% de las familias con inicio temprano y patrón de herencia autosómico dominante, sin embargo existen familias con las mismas características pero debidas a mutaciones en los genes de las presenilinas y éstas corresponden entre un 50 a 70% de los casos (Gómez-Isla y cols., 1997, 1999).

4.1 LOCALIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS PRESENILINAS.

Schellenberg y cols. (1992), encontraron ligamiento en familias de inicio temprano y herencia AD con marcadores del cromosoma 14, este hallazgo fue confirmado por otros autores (Mullan y cols., 1992; St George-Hyslop y cols., 1992; Schellenberg y cols., 1992).

Este gen se clonó en 1995, se localizó en la región 14q24.3 y codifica para una proteína denominada S182 en la cual se encontraron 5 mutaciones que cosegregan en pacientes con EA familiar de inicio temprano (Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995; Sherrington y cols., 1995).

El gen codifica para la proteína S182 que también se ha llamado Presenilina 1 (PS-1), es una proteína integral de membrana con 8 dominios transmembranales cuyos extremos amino y carboxilo terminal se orientan hacia el citosol (Fig. 8), las mutaciones PS-1 aumentan la producción del $A\beta$ y se ha demostrado que el amiloide que se deposita es de 42 a 43 a.a. (Mann y cols., 1995).

El gen de la *PS-1*, está constituido por 12 exones de los cuales los dos primeros son regiones 5' no traducidas de manera que la proteína está codificada por los exones del 3 al 12 resultando en una proteína de 467 a.a.

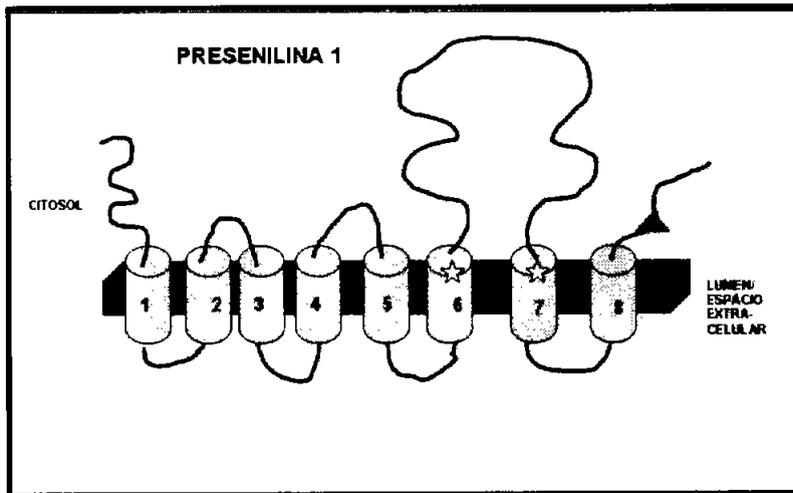


Fig. 8. Representación esquemática de la topología transmembranal para la Presenilina 1 humana, en donde las estrellas representan sitios putativos con residuos de ácido aspártico y el triángulo representan motivos conservados (tomada y modificada de Pointing y cols., 2002).

El gen de *PS-1* presenta procesamiento alternativo y el Grupo Colaborativo para el estudio de la EA en 1995, encontró en 40 familias de inicio temprano 6 mutaciones diferentes a las previamente descritas.

Hasta la fecha se han encontrado al menos 60 mutaciones con sentido equivocado y en el marco del sitio de procesamiento (splicing), este gen se ha considerado responsable de la EA en la mayoría de las familias de inicio temprano (Cruts y cols., 1996).

En 1995 también se localizó y clonó el gen responsable de la EA en el grupo de familias de los germanos del Volga, se encontró en 1q42.1, produce una proteína llamada STM2 o presenilina 2, la cual tiene 67% de homología en la secuencia de a.a. con la presenilina 1 (Cruts y cols., 1996; Levy-Lahad y cols., 1995b, 1995c).

Todas las mutaciones descritas hasta la fecha involucran a.a. que están conservados y distribuidos a lo largo de ambas presenilinas como se muestra en la Fig. 8.

Los genes que codifican para las *presenilinas 1* y *2* tienen 12 exones, la PS-1 tiene 467 a.a. y la PS-2 448 a.a., se observa mayor homología en los dominios transmembranales (TM) y en menor grado hacia la región amino terminal.

Ambas se expresan en diferentes tejidos como: corazón, hígado, páncreas, bazo, riñón, testículo y cerebro, sus transcritos están presentes en neuronas de hipocampo, corteza cerebral, cerebelo y plexos coroides (Levy-Lahad y cols., 1995c).

4.2 FUNCIÓN DE LAS PRESENILINAS EN LA EA.

El análisis histoquímico de secciones de cerebro de pacientes con EA usando un anticuerpo policlonal para el carboxilo terminal de la presenilina 1, ha permitido localizarla en las placas neuríticas en forma similar al β -amiloide.

La función de las presenilinas se desconoce, sin embargo se han descrito genes ortólogos con los que comparte homología en una gran variedad de organismos que van desde el nematodo primitivo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, 57%) e incluso plantas como la *Arabidopsis thaliana* (33%) y en un 90% con *Xenopus laevis*. Esta homología con otras especies reside en la secuencia de a.a. dentro de las regiones hidrofóbicas (Fraser y cols., 2000).

El gen *Sel 12* de *C. elegans* afecta la vía de señalamiento intercelular mediada por *lin12/notch* (Czech y cols., 2000). Un segundo gen de *C. elegans* *spe 4* se expresa en organelos de unión a membrana derivados de Golgi de espermatoцитos primarios, se requiere para la unión de los organelos a los cuerpos fibrosos de estos precursores espermáticos y esta unión es esencial para la distribución adecuada de proteínas durante la meiosis de *C. elegans* (Wittenburg y cols., 2000; Yu y cols., 2000).

La presenilina 1 humana muestra un 48% de identidad en su secuencia de a.a con la proteína sel-12, la cual participa durante el desarrollo de *C. elegans* en la transmisión directa de señales de la superficie al núcleo. La presenilina 2 muestra homología con alg-3 una proteína que bloquea la transducción de señales durante la inducción por células T de muerte celular por apoptosis (Czech y cols., 2000; Wittenburg y cols., 2000).

Recientemente se han desarrollado ratones deficientes en PS1 y se ha demostrado que la PS1 de mamífero también puede funcionar en el señalamiento Notch (Hoicomb y cols., 1998; Kostyszyn y cols., 2001).

Los ratones nulicigóticos mueren antes o poco después del nacimiento con malformaciones esqueléticas, pérdida de células neuronales y hemorragias severas en cerebro y médula espinal, estos hallazgos sugieren que PS1 se requiere para el desarrollo del SNC (Donoviel y cols., 1999; Russo y cols., 2001).

La mayoría de las mutaciones son puntuales y producen la sustitución de un aminoácido, están predominantemente localizadas en los dominios transmembranales (TM) altamente conservados, cercanos a la interfase de la membrana, o en el amino terminal hidrofóbico, o en los residuos hidrofóbicos del C-terminal putativos a la horquilla del dominio TM6-TM7 y se muestran en la Fig. 9.

Se han identificado dos mutaciones que afectan el sitio de splicing, una mutación puntual en el sitio aceptor de splicing hacia el extremo 5' localizado en el exón 9. Esta mutación ocasiona que este exón se fusione con el exón 11, removiendo una serie de residuos cargados (carga ácida) en la punta de la horquilla hidrofílica, entre los dominios TM6 y TM7 sin embargo esta no modifica el marco de lectura de la proteína (Queralt y cols., 2000; Russo y cols., 2000, 2001).

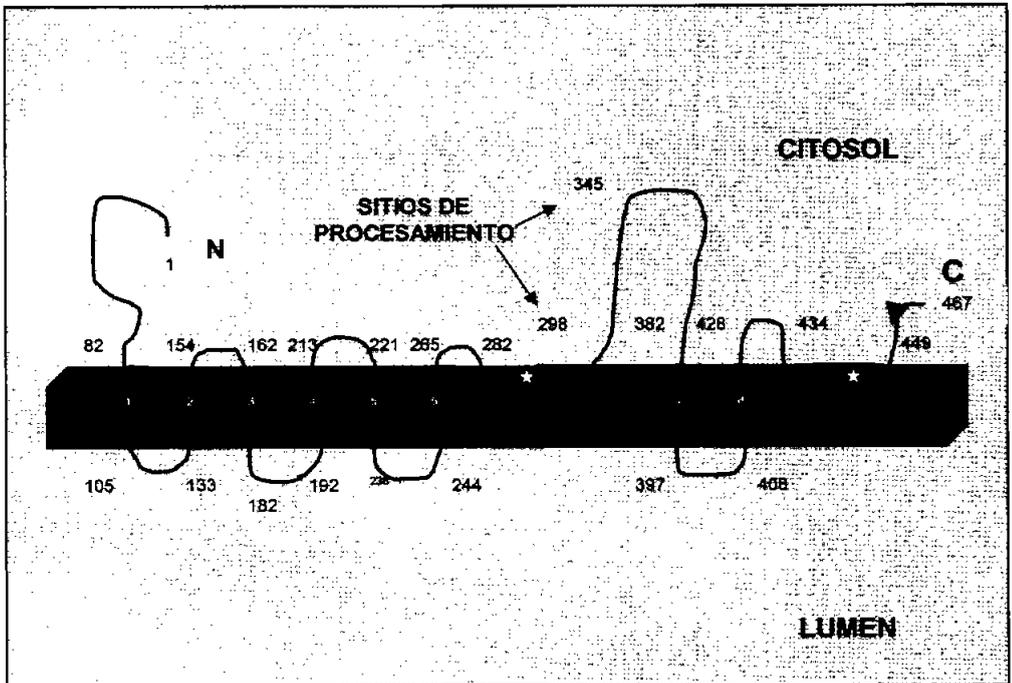


Fig. 9. Representación esquemática actual de la topología de la Presenilina 1 humana, en donde se muestran los ocho sitios transmembrales (TM) y la distribución de mutaciones. Las estrellas amarillas representan regiones hidrofóbicas (RH7 y RH8), entre ambas una asa hidrofílica mayor, las estrellas verdes sitios putativos con residuos de ácido aspártico y el triángulo representa motivos conservados (Tomada y modificada de Czech y cols., 2000).

La segunda mutación en el sitio de splicing resulta de la deleción de una G (guanina) del nucleótido del sitio donador de splicing localizado hacia el extremo 3', en el exón 5. Por lo que es necesario usar un sitio donador alternativo, causando una inserción en el marco de lectura de una tirosina dentro de la horquilla formada entre los dominios TM1 y TM2 (Rogaev y cols., 1997; Russo y cols., 2000).

Para entender los mecanismos patológicos de las mutaciones en *PS1*, en pacientes con EA familiar de inicio temprano es importante determinar si se debe a una ganancia o pérdida de la función, el hecho es que estas mutaciones incrementan la producción del β A-42/43 influyendo en las actividades de γ y β secretasas (Ponting y cols., 2002; Russo y cols., 2000).

Esto se ha confirmado parcialmente por dos observaciones en ratones knockout (*PS*^{-/-}): primero, estos animales presentan un fenotipo de mortalidad perinatal temprana, sin evidencia de enfermedad de Alzheimer (Czech y cols., 2000).

Esta pérdida de función en animales con el fenotipo (*PS*^{-/-}), puede ser completamente rescatada por transgenes silvestres (wildtype) o *PS1*, ya que los ratones con mutaciones homocigotas no sobreviven al primer día de vida. Mientras aquellos con mutaciones heterocigotas pueden ser viables y fértiles y sólo presentar algunas alteraciones fenotípicas como: bajo peso al nacer, estatura corta, anomalías esqueléticas en la columna vertebral, curvatura en la cola (Donoviel y cols., 1999).

Las alteraciones esqueléticas observados en ratones knockout para *PS1*, se observan al 9º día de vida embrionaria y hallazgos similares se han encontrado en animales knockout para la proteína Notch y *DLL1* (homólogo de Notch en drosófila) sufren una anomalía similar en la somitogénesis, lo cual ha sugerido una relación entre *PS1* y Notch.

La vía de señalización Notch es importante para el desarrollo embrionario, la hematopoyesis y la diferenciación neuronal. Confirmándose estos resultados en ratones nulicigóticos para *PS1* que son embriogénicamente letales y muestran malformaciones esqueléticas y defectos del SNC causados por la pérdida de células neuronales y hemorragias severas las cuales indican que *PS1* se requiere para el desarrollo del SNC (Struhl y cols., 2000).

Los ratones (PS^{-}) tienen un defecto en el procesamiento de la PPA manifestándose por una falla en el corte realizado por la γ -secretasa y la acumulación de fragmentos C-terminal de la PPA producidos por el corte de α y β -secretasas. El defecto en el procesamiento PPA es completamente revertido por transgenes silvestres o mutantes PS1 (Qian y cols., 1998; Rosenberg, 2000).

La ganancia de función es dada por los transgenes mutantes porque además inducen a un incremento del β A-42, lo cual es consistente con los efectos bioquímicos de las mutaciones PS1. Sin embargo y usando cDNAs de PS1 humana en ensayos de complementariedad de mutantes *sel12* en *C. elegans* sugieren que la PS1 humana tipo silvestre es capaz de complementar la pérdida de la función en mutantes *sel12*, pero no así los cDNAs de PS1 mutantes (Price y cols., 1998; Struhl y cols., 2000).

Independientemente de que las mutaciones en PS1 o PS2 causen una ganancia o pérdida de la función, se ha visto que probablemente un efecto sea alterar el procesamiento de la PPA al favorecer la producción del péptido de 42 a.a., potencialmente tóxico (Sisodia y cols., 1999; Lleo y cols., 2002).

La liberación del péptido tóxico forma parte del mecanismo por el cual es procesada la PPA por γ -secretasas, ya que el amiloide polimeriza en la placa neurítica con una configuración de hojas beta contribuyendo así a su neurotoxicidad. Es interesante también como las placas amiloides co-localizan con diversas moléculas involucradas también en la patogénesis de la EA, incluyendo ubiquitina, APOE, α_1 -anti-quimotripsina, α_2 -macroglobulina, PS1 y PS2 (Hutton y cols., 1997).

En cultivo de fibroblastos con mutaciones PS1 se produce un incremento del 50% de productos de corte de 28 y 18 kD incrementándose también en un 50% la producción β -amiloide de 42 a.a., sugiriendo que el corte por presenilina tiene un efecto directo sobre la síntesis y procesamiento del β -amiloide (Lleo y cols., 2001).

Las presenilinas pueden funcionar influyendo en la actividad de γ -secretasas o puedan ser una γ -secretasa (Czech y cols., 2000; Fraser y cols., 2000).

Las mutaciones en *PS1* incrementan la actividad de caspasas (proteasas específicas de aspartato dependientes de cisteína), inducen apoptosis y una desregulación en importantes vías de señalización, en el plegamiento de proteínas de respuesta en el retículo endoplasmático (Scheper y cols., 2000).

El análisis genético del gen de la *PS2*, ha identificado 2 mutaciones en sentido equivocado, en familias con un inicio temprano. La primera mutación Asn141Ile fue detectada en un grupo de familias llamados los germanos del Volga, la segunda mutación Met239Val fue descubierta en una familia italiana, sin embargo las mutaciones en este gen son muy raras (Russo y cols., 2001).

Otra profunda diferencia entre las mutaciones en *PS1* y *PS2*, es que el fenotipo asociado con *PS2* es mucho más variable, así el rango de edad de inicio en portadores heterocigotos de mutaciones en *PS2* es entre 40 y 80 años de edad. Existe una falta de penetrancia en algunos octogenarios que transmiten la enfermedad a su descendencia, en contraste con el reducido rango de edad de inicio y la alta penetrancia de las mutaciones en *PS1* (Gómez-Isla y cols., 1999).

Estas diferencias se observan a pesar de las fuertes similitudes en estructura y en secuencia de a.a. de las proteínas *PS1* y *PS2*, pero es probable que tengan actividades similares o las sobrelapen. Esto se apoya en el hecho de que ambas presenilinas incrementan la secreción del péptido β -amiloide ₄₂, además de que las mutaciones en *PS2* también incrementan la sensibilidad a apoptosis, pero no es claro aún si se trata de un efecto independiente (Lleo y cols., 2001).

5. FACTORES GENÉTICOS EN LA EA.

Las mutaciones en *PS-1*, *PS-2* y *PPA* conducen a la patología de la EA familiar a través de una vía bioquímica común, y en el caso de *PS1* condicionan a un inicio más temprano y severo de la enfermedad.

No se han encontrado evidencias de que las mutaciones de estos 3 genes estén involucradas en la EA de inicio tardío, sin embargo la posibilidad de nuevos loci no puede ser excluida. Debido a que la mayoría de los casos de EA son esporádicos o presentan una limitada agregación familiar y suelen ser de aparición tardía (después de los 65 años) hacen compleja a esta enfermedad (Ray y cols., 1998; van-Duijn y cols., 1994).

La evidencia de que hay influencia genética en estos casos dio lugar a la búsqueda de factores de riesgo genético como la apolipoproteína E (van-Duijn y cols., 1994; Warwick y cols., 2000).

Tabla 2. Se indican los genes involucrados y el patrón de herencia en la enfermedad de Alzheimer.

| CROMOSOMA | GEN | EDAD DE INICIO | PROPORCIÓN DE CASOS | TIPO DE HERENCIA |
|------------------|-------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|
| 21 | APP | Temprano | < 1% | AD |
| 14 | PS 1 | Temprano | < 5% | AD |
| 1 | PS 2 | Temprano | < 1% | AD |
| 19 | APOE | Tardío | 40-50% | Factor de riesgo |
| ? | ? | Tardío | | ? |

6. LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.

Los lípidos, por su carácter hidrofóbico, no se encuentran circulando libres en el plasma, sino que se unen a proteínas, conformando complejos macromoleculares solubles, denominados lipoproteínas (Denis, 1977).

Los lípidos, por su carácter hidrofóbico, no se encuentran circulando libres en el plasma, sino que se unen a proteínas, conformando complejos macromoleculares solubles, denominados lipoproteínas (Denis, 1977).

Las lipoproteínas transportan todos los lípidos que circulan en plasma: colesterol, en su forma libre y ésterificado, triglicéridos (TG) y fosfolípidos (FL), aunque varía ampliamente su tamaño, todas ellas parecen ser microemulsiones (Tall, 1995b).

Las partículas lipoproteicas son esféricas y contienen un centro o núcleo hidrofóbico, de lípidos no polares (triglicéridos y colesterol ésterificado) y una superficie hidrofílica en monocapa compuesta de lípidos polares: fosfolípidos y colesterol libre, intercalados por moléculas proteicas que permiten la solubilidad de los complejos (Lehninger y cols., 1993a).

La fracción proteica de las lipoproteínas se halla integrada por diferentes polipéptidos específicos, denominados apoproteínas (Apo) que se designan por letras como se muestra en la Tabla 3.

Estas intervienen activamente en el metabolismo de las lipoproteínas, desempeñan funciones específicas como: cofactores enzimáticos o mediadores en la interacción con receptores específicos de membrana.

Tabla 3. Apoproteínas de las lipoproteínas del plasma humano.

| Apoproteína | PM | Características |
|--------------------|-----------|---|
| A-I | 29,016 | Proteína principal en HDL, activa LCAT, se sintetiza en hígado e intestino. |
| A-II | 17,414 | Proteína mayor en HDL, se sintetiza en hígado e intestino. |
| A-IV | 44,465 | Se sintetiza en hígado e intestino. |
| B-48 | 241,000 | Se encuentra en quilomicrones, activa LCAT y LPL, sintetiza en intestino. |
| B-100 | 512,723 | Proteína mayor en LDL y en pequeña proporción en LDL y VLDL, activa LCAT y LPL, se sintetiza en hígado. |
| C-I | 6,630 | Se encuentra en quilomicrones, activa LCAT y LPL, se sintetiza en hígado. |
| C-II | 8,900 | Se encuentra en VLDL, activa LCAT y se sintetiza en hígado. |
| C-III | 8,800 | Se encuentra en quilomicrones, VLDL y HDL, inhibe LPL, se sintetiza en hígado. |
| D | 19,000 | Se encuentra en HDL y se sintetiza en muchas fuentes. |
| E | 34,143 | Se encuentra en VLDL, LDL y HDL, se sintetiza en hígado. |

LCAT: lecitina-colesterol aciltransferasa, LPL: lipasa lipoproteica, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, LDL: lipoproteínas de baja densidad.

La densidad de las lipoproteínas está inversamente relacionada con su tamaño, reflejando el contenido relativo de baja-densidad, centro o núcleo de lípidos no polar y alta-densidad en la superficie proteica y basándose en esta densidad, composición y propiedades funcionales, las lipoproteínas se separan en diferentes clases, como se muestran en la tabla 4 y Fig. 10.

Tabla 4 .Composición química de las lipoproteínas plasmáticas normales.

Componentes de la superficie Lípidos del centro

| Clase | Densidad g/ml | % | | | | |
|----------------------|--------------------|------------|--------------|-----------------|---------------|-----------------------|
| | | Colesterol | Fosfolípidos | Apolipoproteína | Triglicéridos | Ésteres de colesterol |
| QUILOMICRONES | 0.93 | 2 | 7 | 2 | 86 | 3 |
| VLDL | 0.93-1.006 | 7 | 18 | 8 | 55 | 12 |
| IDL | 1.006-1.019 | 9 | 19 | 19 | 23 | 29 |
| LDL | 1.019-1.063 | 8 | 22 | 22 | 6 | 42 |
| HDL | 1.063-1.210 | 4 | 35 | 55 | 3 | 13 |

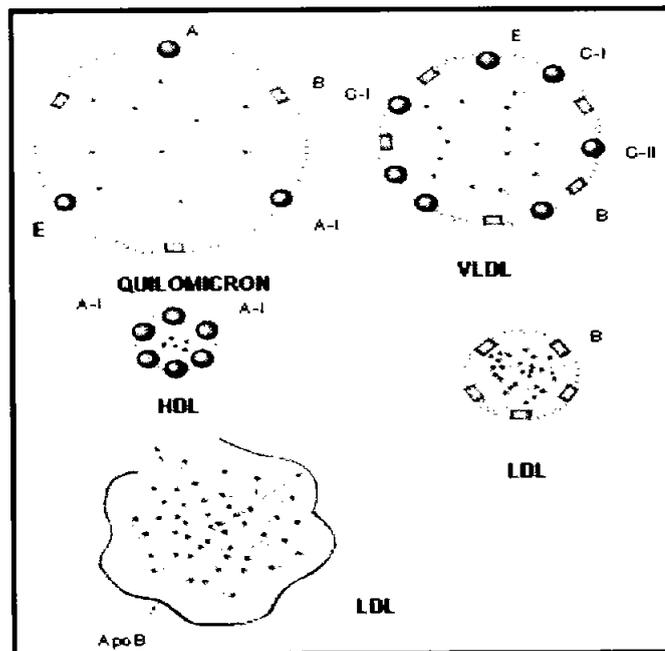


Fig. 10. La composición proteica de las diferentes lipoproteínas incluyendo las apolipoproteínas A, B, C y E en quilomicrón, VLDL, HDL y LDL.

Las dos clases mayores contienen principalmente triglicéridos en sus centros o núcleos y son: los quilomicrones y las VLDL.

Los **Quilomicrones**: se sintetizan en el intestino y son secretados por enterocitos con la función de transportar triglicéridos y colesterol de la dieta. El 90% de su contenido lipídico son los triglicéridos, el resto colesterol y fosfolípidos. Sus constituyentes apoproteicos son: Apo B-48, ApoA-1, ApoA-2, ApoA-4, ApoC-1, ApoC-2, ApoC-3 y ApoE.

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL): son sintetizadas y secretadas por hígado, la porción lipídica contiene 60% de triglicéridos, 20% de colesterol y el resto son fosfolípidos. Sus componentes apoproteicos son: ApoB100, ApoC-1, ApoC-2 y ApoE.

Las VLDL tienen la función de transportar los triglicéridos de síntesis endógena, que son secretados desde el hígado a la circulación, además de redistribuir ácidos grasos a los diferentes tejidos que lo requieren.

Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL): son el producto del catabolismo parcial de las VLDL, por cada molécula de VLDL que se degrada se produce una IDL. Existe una transferencia total de ApoB 100 desde la VLDL, mientras que se van perdiendo otras apoproteínas como ApoC y E, a la vez que se catabolizan los triglicéridos por acción de la enzima lipasa hepática.

Lipoproteínas de baja densidad (LDL): son el producto final de las IDL, se originan en el plasma como una lipoproteína más pequeña, muy rica en colesterol ésterificado y con un contenido apoproteico casi exclusivo de ApoB100.

Las LDL distribuyen el colesterol a los tejidos que los requieren para la reposición de los componentes de membranas celulares o para la síntesis de hormonas esteroideas. También participan en la regulación de la biosíntesis de

colesterol a través de su unión a receptores específicos (Lehninger y cols., 1993b; Russell y cols., 1999).

Lipoproteínas de alta densidad (HDL): son un grupo heterogéneo de partículas, las apoproteínas constituyen el 50% de la partícula, siendo la principal A1. El 40% de su contenido lipídico es colesterol y el 60% son fosfolípidos y escasos triglicéridos (Lehninger y cols., 1993c; Yeagle, 1985).

Las HDL se sintetizan en hígado y se forman a lo largo del catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Su función es transportar el colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado, para su catabolismo en ácidos biliares o su incorporación a nuevas lipoproteínas (Kwiterovich, 2002a), como se muestra en la Fig. 11.

El conocimiento del transporte de lípidos en la sangre, ha permitido el descubrimiento de mutaciones que afectan al gen principal de las apolipoproteínas, que son la clave de enzimas y proteínas de transferencia que controlan el transporte de lípidos y el reconocimiento de receptores específicos de estas apolipoproteínas. Los componentes de las apolipoproteínas son sintetizados primeramente en hígado y aproximadamente un 20% son producidas por células de la mucosa intestinal (Kwiterovich, 2002b; Mahley y cols., 1995).

Muchas de estas apolipoproteínas poseen regiones helicoidales de repetidos anfipáticos (apoproteína A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E). Estas proteínas son productos de una familia de multigenes en los cuales la región codificante está compuesta de repetidos en tandem de 11 codones, indicando que estos genes son el resultado de duplicaciones de un gen primordial (Duriez y cols., 1999; Havel y cols., 1995; Utermann, 1995).

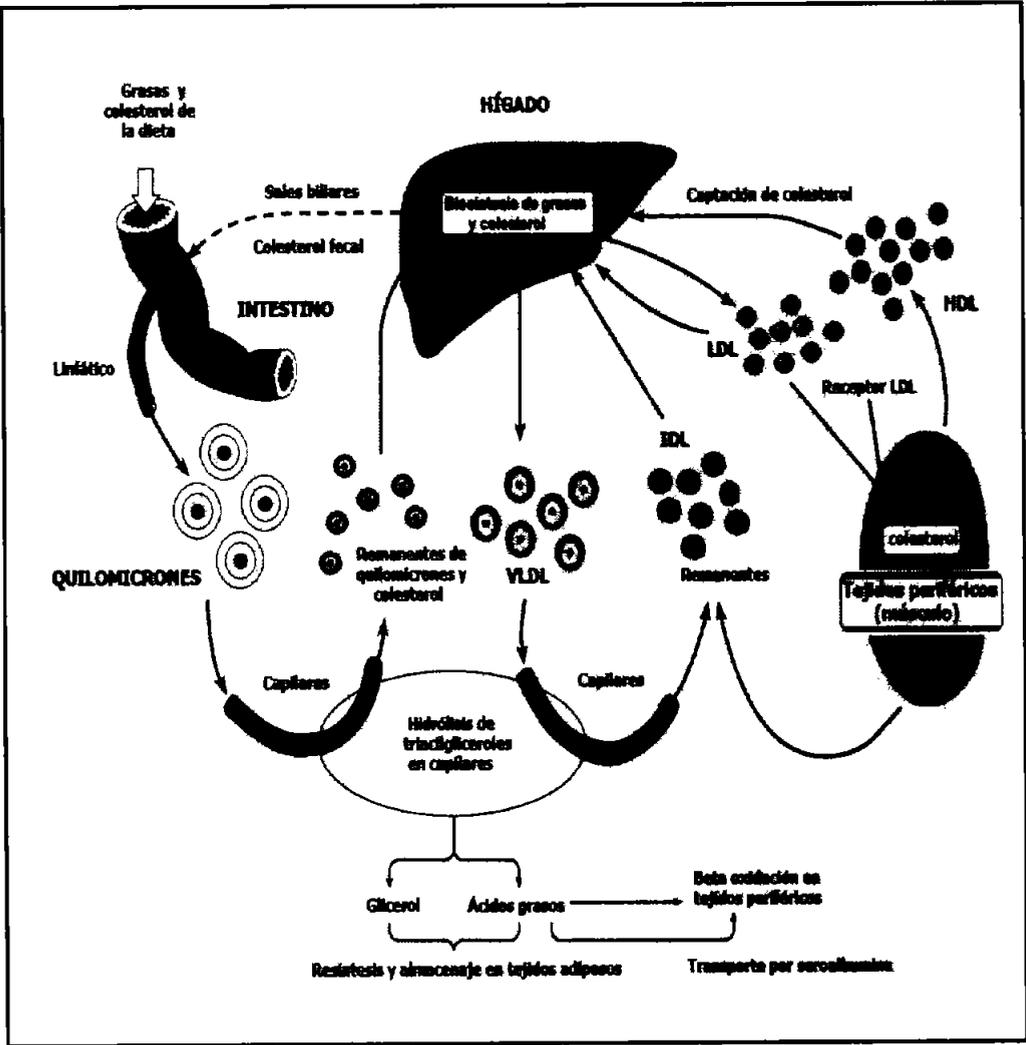


Fig. 11. Transporte y metabolismo de las diferentes lipoproteínas, algunos ácidos grasos son absorbidos por las células vecinas, mientras que otros son insolubles y pueden formar complejos con albúmina sérica para transportarse a más células distantes. Después de la absorción dentro de la célula, el glicerol y los ácidos grasos derivados de la acción de lipoproteinlipasas pueden ser catabolizados para generar energía o almacenarse en células adiposas para ser utilizados en la resíntesis de triacilglicerol.

6.1 ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN EL METABOLISMO LIPOPROTEICO

Tres enzimas tienen un papel importante en el transporte lipoproteico y son: lipasa lipoproteica, lipasa hepática y lecitina colesterol aciltransferasa, cuyas características se mencionan en la Tabla 5.

Lipasa lipoproteica (LPL). Pertenece a una familia de genes que incluyen a la lipasa hepática, lipasa pancreática y la lipasa endotelial (Goldberg, 1996). LPL es la enzima responsable de la hidrólisis o liberación de los ácidos grasos que componen los triglicéridos de las VLDL y los quilomicrones produciendo así lipoproteínas intermedias y quilomicrones remanentes.

El gen LPL fue localizado por estudios de ligamiento en el cromosoma 8p22 (Emi y cols., 1993). LPL se sintetiza principalmente en células endoteliales de los capilares del tejido adiposo, muscular, esquelético y cardíaco. La actividad LPL es regulada por procesos intracelulares y la actividad máxima requiere de la presencia de ApoC2, contenida en lipoproteínas ricas en triglicéridos (Havel y cols., 1973; Shen y cols., 2002).

Lipasa hepática (LH). Actúa a continuación de la LPL, hidrolizando los triglicéridos y fosfolípidos presentes principalmente en los remanentes de quilomicrones, IDL y HDL. Sirve como cofactor del metabolismo selectivo del colesterol de las HDL mediante el receptor SR-B1 (Lambert y cols., 1999).

El gen de LH se localiza en el cromosoma 15q21-23 (Sparkes y cols., 1987), se sintetiza en las células parenquimatosas del hígado y se localiza en el endotelio vascular de los hepatocitos, ovarios, glándulas suprarrenales a través de los proteoglicanos sulfato de heparina.

A diferencia de la LPL no requiere ApoC2 como activador, pero es inducida por insulina y regulada por enzimas tiroideas y estrógenos, la actividad se suprime por estradiol y se incrementa por la testosterona, afectando los niveles de HDL (Perret y cols., 2002).

Lecitín-colesterol aciltransferasa (L-CAT). Se sintetiza en hígado pero actúa en plasma, el gen de la LCAT fue localizado en el cromosoma 16q22 (Teisberg y cols., 1974). Es la responsable de la esterificación del colesterol circulante en el organismo. Se encuentra en el plasma asociado a las HDL que contienen el activador específico de la enzima: ApoA1, aumentando de igual manera la velocidad del transporte reverso del colesterol (Tall y cols., 1995a; Tall y cols., 1995b).

Todo el colesterol que contienen las HDL, VLDL y LDL se esterifica por acción de LCAT y éste es transferido a otras lipoproteínas y tejidos por medio de una proteína transportadora de ésteres colesterol (CETP), este transporte contribuye al transporte reverso del colesterol (Duriez y cols., 1999; Mitchell y cols., 1980).

Tabla 5. Enzimas que intervienen en el transporte de lípidos.

| Enzima | PM | Fuente | Substratos |
|-------------------------------------|--------|--|--|
| Lipoproteína lipasa | 50,394 | Tejido adiposo (adipocitos) | Triglicéridos y fosfolípidos de quilomicrones y grandes VLDL |
| Lipasa Hepática | 53,222 | Músculo estriado, hígado (hepatocitos) | Triglicéridos y fosfolípidos de pequeños VLDL, IDL y grandes HDL |
| Lecitina-colesterol Aciltransferasa | 47,090 | Hígado | Colesterol y fosfatidilcolina de especies de HDL |

6.2 RECEPTORES DE LIPOPROTEÍNAS.

Existen receptores de membrana responsables de la interacción de las lipoproteínas con las células, el sistema de receptores más conocido es el que interviene en la degradación de la LDL, estos son los receptores-LDL cuya ausencia o deficiencia causan hipercolesterolemia familiar, la interacción con las lipoproteínas es mediada por apolipoproteínas específicas, en este caso intervienen ApoB y ApoE (Goldstein y cols., 1985).

El colesterol que se libera en el citoplasma tras la unión con el receptor-LDL, regula la biosíntesis del colesterol intracelular. Las funciones de estos receptores son: la regulación de los niveles plasmáticos de LDL; redistribución del colesterol a cargo de las lipoproteínas que contienen ApoB y/o ApoE; utilización del colesterol para el recambio de las membranas celulares y síntesis de hormonas (Tall, 1995).

Existe otro tipo de receptores de localización hepática, que no interaccionan con las lipoproteínas por medio de ApoB y son los receptores-apoE, estos permiten la captación del colesterol de la dieta por su interacción con los remanentes de quilomicrones y por otra parte cumplen con el transporte inverso del colesterol, reconociendo a la ApoE de las HDL que llegan al hígado sobrecargadas de colesterol (Genest y cols., 1999).

Otro tipo de receptores es el que se encuentra en los macrófagos, son los receptores "scavenger o basurero". Los macrófagos forman parte de la lesión ateromatosa, la síntesis de sus receptores no se encuentra regulada por el nivel de colesterol intracelular, por lo tanto incorporan y acumulan colesterol ésterificado en su citoplasma dando el aspecto a las células de espumosas (Acton y cols., 1996; Wang y cols., 1998).

Algunas de las lipoproteínas que pueden unirse a estos receptores son las LDL nativas, LDL acetiladas, LDL rica en TG, LDL oxidada, LDL glicosilada, LDL carbamilada, IDL (Goldstein y cols., 1985; Kowal y cols., 1989.).

El catabolismo final de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B ocurre por endocitosis mediada por receptor, mientras que los mecanismos del catabolismo final de partículas HDL es menos conocido (Brown y cols., 1981; Trigatti y cols., 2000).

El receptor LDL se une a apo B-100, así como apo E, de esta manera media la endocitosis del catabolismo parcial de VLDL, IDL y LDL.

El receptor LDL es una proteína transmembranal en donde se unen las partículas lipoproteicas vía apo B-100 o apo E y son endocitadas en forma de "coated pits" en la membrana plasmática. Las lipoproteínas se disocian del receptor por la acidez del medio ambiente interno del endosoma y son eventualmente catabolizadas en lisosomas secundarios (Mahley, 1986).

El receptor se separa del endosoma en compartimentos pre-lisosomales y es reciclado a la superficie de la célula para iniciar otro ciclo de endocitosis. El número de receptores LDL está fuertemente determinado por la disponibilidad del colesterol. (Fig. 12)

La determinación en plasma de triglicéridos, LDL, colesterol y HDL, junto con estimación cualitativa de quilomicronemia es usualmente suficiente para determinar la naturaleza y severidad de las hipertipidemias, sin embargo en muchos de estos trastornos, es necesario realizar pruebas diagnósticas especiales para detectar cantidades anormales o estructurales de apolipoproteínas o de las enzimas encargadas del transporte de lípidos (Trigatti y cols., 2000).

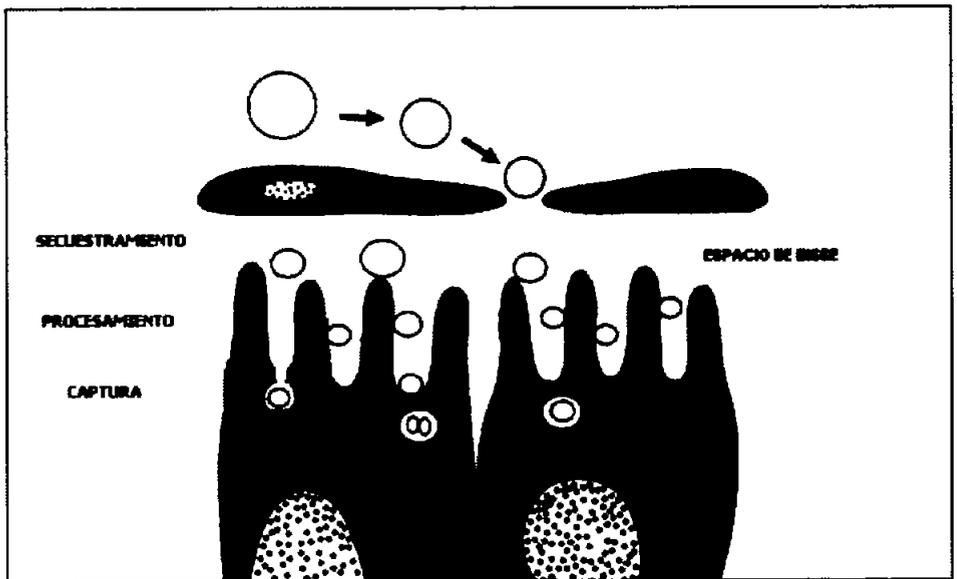


Fig. 12. Vías involucradas en la captación de remanentes del plasma. Diversos pasos están involucrados como: **Secuestramiento** de lipoproteínas en los espacios de Disse, mientras que los proteoglicanos de heparán sulfato dentro del espacio de Disse se unen a remanentes enriquecidos por apoE; **el procesamiento** involucra la hidrólisis lipolítica por la lipasa hepática en el hígado o lipoproteína lipasa asociada con remanentes cuando entran al espacio de Disse; y la **internalización** parece estar mediada por ambos receptores LDL y RLP.

7. APOLIPOPROTEÍNA E.

En el año de 1991, se estableció una región candidata como resultado de una búsqueda sistemática de nuevos genes en familias de inicio tardío, en las que previamente se había encontrado ligamiento cercano a los marcadores *BCL3* y *ATPIA3*, los cuales mapean en el cromosoma 19q12-q13 (Pericak-Vance y cols., 1991).

7.1 LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DEL GEN APOE.

El subsiguiente análisis de genes reveló que el gen candidato responsable del locus genético efectivamente se localizaba en el brazo largo del cromosoma 19q13.2 (Fig.13) y corresponde al gen de la *Apolipoproteína E (APOE)* (Pericak-Vance y cols., 1991; Strittmatter y cols., 1993a).

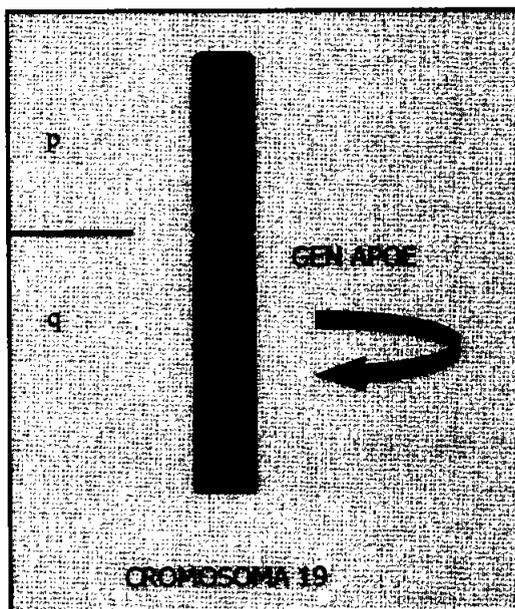


Fig. 13. Ideograma del cromosoma 19 humano donde se muestra la localización del gen de la *Apolipoproteína E (APOE)*.

El gen *APOE* en humanos posee tres secuencias polimórficas denominadas $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$. Strittmatter y cols. (1993b), reportaron que la ApoE tiene elevada afinidad para unirse al β -amiloide, así como un incremento en la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en pacientes con EA familiar de inicio tardío. Identificándose al alelo $\epsilon 4$ del gen de la *APOE* como factor de riesgo en familias con EA de inicio tardío (Evans y cols., 1997; Kamboh, 1995b).

La ApoE se encuentra implicada en el transporte de lípidos y colesterol entre órganos periféricos, debido a su asociación con una gran variedad de lipoproteínas, el ser sintetizada en diferentes tejidos y su interacción con 2 receptores hepáticos (receptor-LDL y receptor-apoE), le dan un papel relevante en el SNC.

Por lo que al favorecerse el complejo ApoE- βA , este se une al receptor relacionado a lipoproteínas, como un evento intracelular temprano que afectan la velocidad con la cual es procesada la PPA, lo cual tiene un papel importante en la generación de la EA (Beisiegel y cols., 1989; Deng y cols., 1995; Muros y cols., 1996).

Los receptores relacionados a lipoproteínas son una superfamilia y son 8 ligandos que se involucran en la EA, entre los que se incluyen: colesterol, PPA, α -2-macroglobulina, el adaptador citoplasmático a proteína FE65 y *APOE* (Kounnas y cols., 1995).

8. ESTRUCTURA DEL GEN APOE

El gen *Apo E* posee 4 exones, tiene una longitud de 3597 nucleótidos, codifica para una glicoproteína madura de 299 a.a., presente en plasma y en líquido cefalorraquídeo. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 19q13.2 y se encuentra en los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad, densidad intermedia y alta densidad, se produce en abundancia en el hígado y en el SNC (Luo y cols., 1986; Walden y cols., 1994).

En 1977 se demostró su naturaleza polimórfica identificándose tres isoformas comunes $\epsilon 4$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 2$. Producto de tres alelos codominantes que dan lugar a 6 genotipos E 4/4, 3/3, 2/2, 4/3, 4/2 y 3/2 (Reiman y cols., 1996; Relkin y cols., 1996).

Las diferencias de estas isoformas se deben a una mutación puntual donde se cambia una base (T por C) e intercambia el aminoácido cisteína por arginina en 2 posiciones, en el residuo 112 y 158 de la proteína (Poirier y cols., 1993; Xu y cols., 1996).

La isoforma más común es la $\epsilon 3$ y se distingue por una cisteína en la posición 112 y una arginina en la posición 158 en la región de unión al receptor de apoE, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Sustitución del aminoácido que distingue a cada isoforma de apolipoproteína E.

| POSICIÓN | $\epsilon 2$ | $\epsilon 3$ | $\epsilon 4$ |
|----------|--------------|--------------|--------------|
| 112 | Cisteína | Cisteína | Arginina |
| 158 | Cisteína | Arginina | Arginina |

La secuencia de DNA y proteína de las regiones que codifican para las isoformas apo E, así como la localización de los residuos 112 y 158 se muestra en la Fig. 14.

▼

E4 DNA taagcttG GCA CGG CTG TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG
 E4 Proteína Ala Arg Leu Ser Lis Glu Leu Gln Ala Ala

| | | |
|----|--|-----|
| | | 112 |
| E2 | | T |
| E3 | ▼ | T▼ |
| E4 | <u>CAG GCC CGG CTG <u>GGC GCG</u> GAC ATG GAG GAC <u>GTG CGC</u> GGC</u> | GGC |
| E4 | Gln Ala Arg Leu Gli Ala Asp Met Glu Asp Val Arg | Gli |
| | | Cis |
| | | Cis |

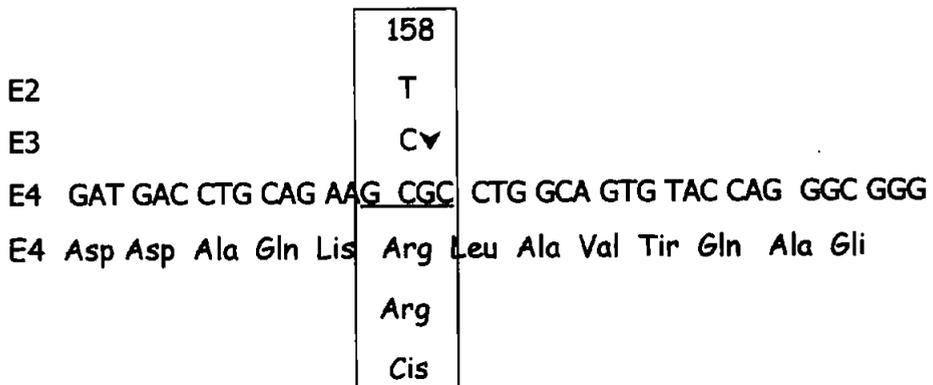
E4 CGC CTG GTG CAG TAC CGC GGC GAG GTG CAG GCC ATG CTC
 E4 Arg Leu Val Gln Tir Arg Gli Glu Val Gln Ala Met Leu

▼

E4 GGC CAG AGC ACC GAG GAG CTG CGG GTG CGC CTC GCC TCC
 E4 Gli Gln Ser Tre Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser

▼

E4 CAC CTG CGC AAG CTG CGT AAG CGG CTC CTC CGC GAT GCC
 E4 His Leu Arg Lis Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala



E4 GCgaattctgt

Fig. 14. Secuencia de DNA y de la proteína de las regiones comunes que codifican para las isoformas apoE, así como los sitios de corte de HhaI, señalados con una flecha. La sustitución de nucleótidos y aminoácidos en el codón 112 y 158, se muestran en una caja.

La sustitución de los nucleótidos en la posición 112 y 158, da como resultado el intercambio de cisteína por arginina, lo que altera el sitio de reconocimiento (GCGC) de la enzima de restricción HhaI. Por lo que los genotipos homocigotos y heterocigotos se pueden distinguir por una combinación única de fragmentos de diferente tamaño (Hixson y cols., 1990).

9. ASOCIACIÓN ENTRE APOE Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

La secuencia que codifica para la variante $\epsilon 3$ refleja la presencia de una cisteína en el codón 112 y una arginina en el codón 158 y está presente en el 75% de los caucásicos. La segunda variante $\epsilon 4$ refleja la sustitución de arginina por cisteína en el codón 112 y tiene una frecuencia alélica del 15% en caucásicos. La tercera variante $\epsilon 2$ contiene cisteína en los codones 112 y 158 y está presente en aproximadamente el 10% de los caucásicos (Hixson y cols., 1990; Poirier y cols., 1993).

El análisis de estas secuencias polimórficas en diferentes poblaciones control sanas ha permitido determinar que las frecuencias de estos alelos varían de 61.9 a 84.6% para $\epsilon 3$ y de 4.6 a 13.0% para $\epsilon 2$, entre las diferentes poblaciones y se presentan entre 7.4 a 29.1% para $\epsilon 4$ (Hallman y cols., 1991; Hong y cols., 1996; Muros y cols., 1996; Sahota y cols., 1997; Tang y cols., 1996, 1998, 2001).

Saunders y cols. (1993a), observaron que la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ era de 0.52 en pacientes con EA esporádicos y de inicio tardío y 0.15 en controles, lo cual indica una diferencia significativa y que la proporción de individuos afectados aumenta con el número de alelos $\epsilon 4$, 20% en sujetos con genotipo 2/3 ó 3/3, a 47% en individuos 2/4 o 3/4 a 91% en sujetos 4/4 (Saunders y cols., 1993b).

Se calculó que los individuos 4/4 tienen 8 veces más riesgo de desarrollar EA que los 2/3 ó 3/3. También hay una relación entre la edad de inicio y la dosis génica, a mayor dosis génica la edad de inicio es más temprana (Roses, 1994; Tierney y cols., 1996). Es importante señalar sin embargo la existencia de individuos sanos de edad avanzada con genotipo 4/4 e individuos con EA, sin el alelo $\epsilon 4$, lo cual indica que el alelo $\epsilon 4$ es solo un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Corder y cols., 1993; Saunders y cols., 1993a, 1993 b).

Corder y cols. (1994), reportaron que el alelo $\epsilon 2$ podría tener un efecto protector para desarrollar la EA, sin embargo esto no es muy claro aun.

La asociación entre el alelo $\epsilon 4$ de *ApoE* y la EA ha sido confirmada en diferentes grupos étnicos y se ha calculado un aumento de riesgo para desarrollar la enfermedad de 2.2 a 4.4 para heterocigotos con alelo $\epsilon 4$ y de 5.1 a 17.9 para homocigotos según diferentes estudios (Maestre y cols., 1995; Tsai y cols., 1994; van-Duijn y cols., 1994).

Sin embargo, algunos investigadores han observado falta de asociación entre el alelo $\epsilon 4$ y la EA (Sobel y cols., 1995). La mayoría de los portadores $\epsilon 4$ no desarrollan demencia y la mitad de los pacientes con EA no tienen asociación con $\epsilon 4$ -*ApoE* por lo tanto no puede usarse como prueba predictiva para detectar portadores de EA en estado presintomático (Lannfelt y cols., 1994).

Aunque la asociación del alelo $\epsilon 4$ con la EA se ha fortalecido, no es completamente específica. Observaciones en pacientes con traumatismo craneoencefálico (TCE), hemorragias intracraneales espontáneas y pacientes sometidos a bypass cardíaco presentan una respuesta pobre y peor pronóstico cuando son portadores del alelo $\epsilon 4$ (Basun y cols., 1996; Greenberg y cols., 1996; McCarron y cols., 1998).

Existen evidencias de un efecto sinérgico de historia de TCE y presencia de alelo $\epsilon 4$ con riesgo para desarrollar EA, ya que este se puede incrementar hasta 10 veces, comparado con 2 veces el riesgo cuando solo se es portador del alelo $\epsilon 4$, el TCE por si solo no incrementa el riesgo (Adle-Biassette y cols., 1996; Friedman y cols., 1999).

10. MECANISMO.

El mecanismo mediante el cual el alelo $\epsilon 4$ de la Apo E constituye un factor de riesgo asociado a un inicio más temprano y por cual el alelo $\epsilon 2$ se asocia a un inicio más tardío de la enfermedad, todavía no se conoce. Sin embargo existen varias hipótesis, una de ellas es que ApoE se une al βA y actúa como un chaperón molecular e interviene en el grado de formación de las fibrillas β amiloide, se sabe que las isoformas ApoE se unen de forma diferente al $A\beta$ (Poirier y cols., 1994). Apo- $\epsilon 4$ promueve la formación de fibrillas $A\beta$ mejor que Apo- $\epsilon 3$ (LaDu y cols., 1994).

Se ha propuesto también interacción con la proteína Tau, el componente más importante de las marañas de neurofibrillas, ya que las distintas isoformas de ApoE muestran diferentes patrones de unión a Tau. Por lo que ApoE podría influir en el grado de formación de fibrillas y por tanto en el desarrollo de las marañas (Strimatter y cols., 1994a; Strimatter y cols., 1994b).

Se ha sugerido que ApoE puede actuar como una proteína de respuesta a daño neuronal, posiblemente transportando lípidos durante la regeneración y remodelación nerviosa. Demostrándose, en experimentos con cultivos de raíces dorsales de neuronas ganglionares en presencia de β -VLDL, Apo ϵ -3 promueve el crecimiento neurítico, mientras que Apo ϵ -4 inhibe el crecimiento y ramificación (Nathan y cols., 1994; Strimatter y cols., 1993a; Strimatter y cols., 1993b).

El alelo $\epsilon 4$ no se ha asociado a los casos de EA familiar de inicio temprano, pero se ha asociado en forma consistente con edad de inicio más temprana y mayor depósito de βA , como lo demuestra un estudio de 359 pacientes, de los cuales se pudo obtener el estudio anatomopatológico en 92 pacientes (Gómez-Isla y cols., 1996; Levy-Lahad y cols., 1995a).

11. ASOCIACIÓN DE APOE CON OTROS GENES Y EA.

Debido a que las mutaciones en PS1, PS2, PPA y el polimorfismo de APOE explican aproximadamente sólo la mitad de la variación genética de la EA, se ha propuesto la existencia de otros loci de susceptibilidad.

11.1 α -2-MACROGLOBULINA.

Se ha identificado un nuevo locus para la EA en la región pericéntrica del cromosoma 12, la α -2-macroglobulina (A2M) la cual muestra una alta afinidad para unirse al β -A compitiendo con ambos APOE y β -A para la captación a través del receptor relacionado a lipoproteínas (Pericak-Vance y cols., 1997).

Se detecta a través de la asociación entre EA y un polimorfismo intrónico de inserción/delección en el sitio 5' de splicing del exón 18 de la A2M, sin embargo este hallazgo no se ha confirmado en otros estudios (Blacker y cols., 1998; Koster y cols., 2000; Liao y cols., 1998; Matthijs y cols., 1998; Zappia y cols., 2004).

11.2 ENZIMA DEGRADADORA DE LA INSULINA.

Los depósitos y la agregación del β -A son la clave de los hallazgos neuropatológicos de la EA, consecuentemente los agentes que pueden inhibir y/o revertir el proceso resultan ser atractivos. Estudios recientes sugieren que el principal papel de la enzima degradadora de insulina (IDE) es la degradación y la captación del β -A secretado por neuronas y células de la microglía.

Por medio de análisis de ligamiento se han identificado seis marcadores cercanos a la presumible localización del *gen IDE* en el cromosoma 10q23-q25, en 435 familias con EA.

La mayor evidencia de ligamiento se observó con el marcador D10S583 ($Z_{\text{máximo}} = 3.3$), que se localizó dentro de las 195 kb del *gen IDE*, siendo mayor el valor de ligamiento en familias de inicio tardío sin el genotipo *ApoE*, 4/4 lo que hace que esta región sea de gran interés para identificar nuevos genes candidatos como factores de riesgo (Bertram y cols., 2000).

11.3 ACETILCOLINESTERASA.

Se ha visto que una copia del alelo $\epsilon 4$ muestra una relación inversa con la actividad de acetilcolintransferasa y la unión a receptores nicotínicos en el hipocampo y corteza temporal de sujetos con EA (Poirier y cols., 1995).

Los casos en que no hay alelo $\epsilon 4$ muestran actividades de acetilcolintransferasa semejantes a los controles normales de la misma edad, contrario a los que si portan el alelo $\epsilon 4$. Estos resultados apoyan el concepto de que ApoE tiene un papel importante en la disfunción colinérgica que se asocia a la EA y puede ser un indicador de la pobre respuesta a la terapia con inhibidores de la acetilcolinesterasa en pacientes con EA (Cooper y cols., 2003a; Cooper y cols., 2003b).

11.4 α -1-ANTIQUIMOTRIPSINA.

Kamboh y cols. (1995), propusieron que el polimorfismo A (ACT*A) del péptido señal de la α -1-antiquimotripsina interacciona con el alelo $\epsilon 4$ de APOE y multiplica el riesgo de desarrollar EA. Encontraron que la frecuencia de $\epsilon 4/4$ aumenta en pacientes con EA con el número de copias heredadas de ACT*A: 10% para ACT/TT, 12% para ACT/AT y 17% para ACT/AA lo que sugiere interacción alelica, sin embargo otros estudios no han confirmado este hallazgo (Corder y cols., 1996a; Helbecque y cols., 1996; Kamboh y cols., 1995a).

11.5 CISTATINA C.

Se ha demostrado por análisis inmunohistoquímico en cerebros de pacientes con EA y en pacientes con angiopatía amiloide cerebral (AAC), co-localización del β -amiloide con otras proteínas amiloidogénicas como la cistatina C (también conocida como señal gamma), dentro de la pared arterial (Thorsteinsson y cols., 1992).

La cistatina C es un inhibidor extracelular de proteasas de cisteína, muy abundante y la mutación en la posición L68Q de la proteína conduce a una de las angiopatías cerebrales amiloides (CAA) –hemorragia cerebral con

amiloidosis familiar tipo Islandés (HCHWA-I) (Bjarnadottir y cols., 1998; Haan y cols., 1994).

Es una forma de amiloidosis autosómica dominante restringida a la vasculatura menor del cerebro, caracterizada clínicamente por infartos recurrentes que conllevan a una muerte prematura.

Los depósitos de cistatina C conducen a una degeneración microvascular y hemorragia cerebral, la proteína mutada se considera el principal componente de los depósitos amiloides. El mecanismo patogénico puede ser similar y estar relacionado con las observaciones *in vitro* de una síntesis y secreción alterada, ya que la proteína mutada forma dímeros de gran estabilidad que reducen su secreción (Balbin y cols., 1993; Thorsteinsson y cols., 1992).

Crawford y cols. (2000), analizaron la frecuencia de un polimorfismo del *gen de la cistatina C (CST3)*, en 309 pacientes con EA y en 134 controles caucásicos encontrando una interacción significativa entre el genotipo *CST3* y la edad de inicio del diagnóstico, sugiriendo que con la edad el riesgo se incrementa a la inversa del riesgo conferido por la ApoE, lo que lo hace considerarlo como un nuevo factor de riesgo en la EA de inicio tardío.

La similitud bioquímica entre CCA en HCHWA-I y la EA es la co-localización del β -amiloide con la cistatina C, lo que hace a este gen un fuerte candidato de futuras investigaciones en ambos padecimientos.

12. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y OTROS FACTORES DE RIESGO.

Una lista de genes candidatos identificados como putativos al loci de susceptibilidad incluye la homocigocidad para el alelo AA del polimorfismo intrónico de la α -1-quimotripsina ya mencionado, sin embargo existen otros factores.

12.1 FACTORES DE RIESGO GENÉTICO.

Okuizumi y cols. (1995), reportaron que el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) contiene una región polimórfica de tripletes repetidos CGG y que el alelo con 5 repetidos se asociaba con mayor frecuencia a pacientes japoneses con EA. Poco después se buscó esta asociación en población caucásica y no se encontró (Okuizumi y cols., 1996).

Además del alelo de 5 repetidos que actúa como un polimorfismo de inserción/delección del receptor VLDL, se reporta el polimorfismo intrónico para el alelo A1 del receptor LDL relacionado a proteínas, el cual muestra asociación con PS1, la variante K de la butirilcolinesterasa, así como la homocigocidad para el polimorfismo Val/Val de la variante Val443Ile de la bleomicina hidroxilasa, etc. (Kehoe y cols., 1998; Lehmann y cols., 1997; McIlroy y cols., 2000).

Múltiples factores han sido propuestos como causa de la neurodegeneración que conducen a la EA, sin embargo la respuesta inflamatoria proceso que forma parte de la cascada de eventos que ocurre en los pacientes no ha sido bien entendida, debido a la presencia de un gran número de mediadores que son citotóxicos y actúan destruyendo neuritas de la corteza cerebral.

Se ha demostrado en ratones transgénicos la sobre-expresión de citocinas pro-inflamatorias bajo el control de promotores específicos del SNC, los cuales muestran una patología más severa, incluyendo la neurodegeneración. Sin embargo, estos hallazgos no son suficientes para demostrar si la respuesta inflamatoria ocurre en la EA, como un medio para remover el daño de otros mecanismos putativos más importantes (Rogers, 2000).

Du y cols. (2000), reportan un polimorfismo del alelo 2 de la interleucina 1a (-899) que se asocia con la patogénesis de la EA, este resultado junto con los hallazgos para proteínas de la fase aguda como la α -1-antiquimotripsina y α -2-macroglobulina.

Esto tiene gran valor en demostrar que la inflamación, no sólo es una respuesta para la eliminación del daño, sino también influye en la sobre-regulación de mediadores inflamatorios, lo cual puede ser benéfico porque conduce a una eliminación más eficiente del tejido cerebral dañado (McGeer y cols., 2001).

Una dificultad sin resolver es si la IL-1 α se sobre-expresa, comparada con la sobre-regulación de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , que está invariablemente co-expresadas, porque tienen el mismo sitio de unión al promotor y los mismos factores de transcripción (factor nuclear IL-6, elemento de multirespuesta y factor nuclear κ B), reportados en corteza cerebral de pacientes con EA, lo que resultaría muy sorprendente si la IL-1 α no se incrementara a la vez (McGeer y cols., 2001).

Esto hace necesario encontrar los medicamentos anti-inflamatorios apropiados para el tratamiento de los pacientes con EA, siendo igualmente importante el tiempo correcto para administrárselas (prevención vs. intervención) (Doraiswamy y cols., 2002).

Recientemente, múltiples factores genéticos han sido propuestos como causa de la neurodegeneración que conduce a la demencia Alzheimer y a sus hallazgos patognomónicos, sin embargo estos genes candidato no han sido confirmados de igual manera que el alelo ϵ 4 de la Apo E en las diferentes poblaciones estudiadas. (Bertram y cols., 2004; Fullerton y cols., 2000; Shellenberg, 1995)

12.2 OTROS FACTORES DE RIESGO.

En el desarrollo de la EA se han establecido otros factores de riesgo como: *la edad de inicio, historia familiar con demencia, síndrome de Down, trauma craneoencefálico y riesgo vascular.*

Edad: se ha considerado a la edad como el factor de riesgo más importante en la EA, ya que se ha observado un incremento de las placas seniles y marañas neurofibrilares conforme aumenta la edad, siendo esto más evidente pasados los 70 años (Breitner y cols., 1999; Post y cols., 1997).

Algunos estudios sugieren que la frecuencia del alelo ApoE ϵ 4 es similar a la encontrada en pacientes con EA, en individuos sin demencia pero con problemas de memoria relacionados con la edad y sugieren que en pacientes con pérdida de memoria, alteraciones en escalas psicológicas y un alelo ϵ 4 el riesgo de desarrollar EA es mayor (Castelli y cols., 1998; Corder y cols., 1996b, 1996c; Myers y cols., 1996; Small y cols., 2000; Tierney y cols., 1996).

En individuos sin demencia homocigotos para ϵ 4 entre 50 a 65 años de edad se ha visto mediante la tomografía por emisión de positrones, una disminución en el metabolismo de glucosa en las mismas áreas afectadas en pacientes con probable EA como: el ángulo posterior, región parietal, temporal y prefrontal pudiendo ser esto una evidencia preclínica de la enfermedad (Blesa y cols., 1996).

Estudios recientes han demostrado que el alelo ϵ 4 no guarda relación con el grado y progresión del deterioro cognitivo en pacientes con EA (Corder y cols., 1996c; Dal Forno y cols., 1996; Growdon y cols., 1996; Plassman y cols., 1996; Rao y cols., 1996).

Historia familiar: la demencia es frecuente en los familiares de primer grado de los enfermos con EA, confirmándose en el 40% historia familiar positiva de demencia.

Algunas familias muestran un patrón de herencia autosómico dominante bien definido (-10%), la mayoría se refieren a casos esporádicos donde probablemente en muchos de ellos, los parientes afectados fallecen por diferentes causas antes de llegar a la edad en que se manifieste la enfermedad. Por lo que el riesgo de padecer la EA en un individuo que tiene un familiar de primer grado con demencia es 2 a 3 veces mayor, que el que le corresponde según su edad (Duara y cols., 1996; Rao y cols., 1996; Ray y cols., 1998).

Síndrome de Down: se ha observado una mayor prevalencia de síndrome de Down en familiares de pacientes con EA (Lai y cols., 1989; Millichap y cols., 2003).

Trauma craneoencefálico (TCE): los individuos que sufren un TCE tienen de 2 a 6 veces mayor riesgo de desarrollar EA al dañarse la barrera hematoencefálica y si a esto se le suma la presencia del factor $\epsilon 4$ de la ApoE, que incrementa la expresión del β -A, se contribuye a acelerar la muerte neuronal y disrupción de la barrera hematoencefálica (Adle-Biassette, 1996; Friedman y cols., 1999; Mayeux, 1995).

Riesgo Vascular: se han incluido a éstos ya que es común encontrar en el adulto mayor hipertensión, diabetes, niveles elevados de colesterol y triglicéridos asociados con el deterioro cognitivo (Basun y cols., 1996; Slioter, 1997).

Existen también **factores de protección** entre los que se incluyen: raza, sexo, dieta, nivel de educación, uso de estrógenos, antiinflamatorios no esteroideos, vitamina E (Goldstein, 2001; Doraiswamy y cols., 2002; Kalmijn, 1997; Tierney y cols., 1996; Xu, 1998).

Raza: se ha observado mayor frecuencia de demencia en negros que en blancos y en judíos por lo que se incrementa la frecuencia de EA. En los asiáticos es menos frecuente la EA que en los caucásicos (Duara y cols., 1996).

Sexo: algunos estudios han demostrado que la demencia es más frecuente en mujeres que en hombres, causada probablemente por la mayor supervivencia de las mujeres, sin embargo esto es relativo.

Actualmente se piensa que el uso de estrógenos en las mujeres menopáusicas les confiere un efector protector ya que desarrollan menos EA, que en aquellas que no se les administra. Los estrógenos ejercen algunas de sus acciones en el SNC a través de las enzimas colinérgicas, se les han atribuido propiedades neurotróficas en el sistema colinérgico (Payami y cols., 1994; Payami y cols., 1996).

Los múltiples factores genéticos y ambientales, que han sido propuestos como causa de la neurodegeneración que conduce a la demencia Alzheimer, no han recibido la misma y amplia confirmación que el alelo $\epsilon 4$ de la ApoE (Bertram y cols., 2004).

La asociación entre el alelo $\epsilon 4$ de la ApoE y la EA ha sido confirmada en diferentes poblaciones, sin embargo en nuestra población no se conoce la frecuencia alélica de cada una de las variantes del gen y menos aún su efecto en la EA, por lo que es de gran interés establecerlo.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

III. HIPÓTESIS

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la EA es la principal causa de demencia en el adulto mayor y es una patología cada vez más frecuente, han hecho que se convierta en un origen de angustia por el hecho de envejecer. Una gran parte de la patogénesis de la EA se conoce ahora gracias a las raras formas familiares de inicio temprano, sin embargo la mayoría de los pacientes desarrollan la forma no familiar donde no se han identificado mutaciones. Pero las variaciones polimórficas de otros genes al parecer influyen en la aparición de la EA, en su presentación más común, la forma tardía por lo que resulta de gran interés investigar y conocer si estas variaciones pueden ser factores de riesgo para desarrollar la EA.

HIPÓTESIS

De los polimorfismos existentes en el gen *ApoE*, el alelo $\epsilon 4$ es el que aumenta el riesgo para desarrollar la EA.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar si el alelo $\epsilon 4$ del gen de la *Apolipoproteína E* es un factor de riesgo para desarrollar enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, en una muestra de pacientes mexicanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la frecuencia de los alelos y genotipos *ApoE* en una muestra de población mestizo mexicana.
2. Determinar la frecuencia de los alelos y genotipos *ApoE* en pacientes con EA de inicio temprano e inicio tardío.
3. Determinar si el alelo $\epsilon 4$ es un factor de riesgo para desarrollar EA.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 SUJETOS DE ESTUDIO.

Para el cálculo de las frecuencias alélicas en la población general se utilizó una muestra de 345 individuos no relacionados, sanos, sin antecedentes familiares de demencia, que acudieron a donar sangre al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNNMVS), así como de organizaciones gubernamentales de jubilados y pensionados (INSEN).

De ellos, 161 eran mujeres y 184 hombres, con un rango de edad de 20 a 94 años, todos eran hijos y nietos de mexicanos o con un abuelo español. A los individuos mayores de 60 años se les aplicó la prueba corta del estado mental de Folstein, la cual se encontró dentro de límites normales.

Para el estudio del riesgo de EA con relación al genotipo, el grupo de casos estuvo conformado por 86 pacientes del INNN que cumplieran los criterios diagnósticos para probable EA propuestos por McKhann y cols (1984), del grupo de NINCDS-ADRDA y por el DSM-IV-R (1987). De los cuales, 62 fueron mujeres y 24 hombres, todos hijos y nietos de mexicanos o con algún abuelo español. Estos pacientes fueron estudiados en las clínicas de Demencia y de Neurogenética del INNNMVS.

Entre los casos se consideraron dos grupos, aquellos que iniciaron antes de los 65 años como "de inicio temprano" (49 individuos) y los que iniciaron a los 65 años o más como "de inicio tardío" (37 individuos); ambos grupos incluyeron casos esporádicos y familiares. Como controles se asignaron aleatoriamente 172 de los 345 individuos sanos utilizados para el estudio de frecuencias alélicas, pareados con los casos por sexo y por edad.

5.2 TOMA DE MUESTRA.

Se tomó una muestra de 20 ml de sangre periférica en tubos vacutainer con anticoagulante ACD, a cada uno de los casos, así como a los 345 controles.

5.3 OBTENCIÓN DEL DNA GENÓMICO.

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de leucocitos sanguíneos, empleando dos métodos de extracción, dependiendo de la cantidad de muestra obtenida. Se empleo fenol-cloroformo, previa digestión con proteinasa K (Sambrook y cols., 1989) o por el método de precipitación por sales/fenol-cloroformo (Miller y cols., 1988, modificado por nuestro laboratorio), siguiendo los siguientes pasos:

5.3.1- LISIS DE CÉLULAS ROJAS.

Se vertió el contenido de los tubos vacutainer a un tubo falcón de 50 ml y se adicionaron 2 volúmenes del amortiguador de lisis de células rojas (5 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 7.6, 10 mM NaCl), se mezclaron por inversión cuidadosamente para después ser centrifugados por 10 min., a 5,000 rpm a 4°C. Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se añadió nuevamente amortiguador para volver a repetir este paso hasta que el botón de células blancas que se forma quedara libre de hemoglobina.

5.3.2- LISIS DE CÉLULAS BLANCAS.

EL botón de células blancas se lisó adicionándole 5 ml del amortiguador de células blancas (10 mM Tris pH 7.6, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8, 0.2 % SDS, 200 µg/ml de proteínaasa K), incubándose a 42 °C, con agitación (50 rpm) durante toda la noche.

5.3.3- EXTRACCIÓN CON FENOL-CLOROFORMO.

- a) Se añadió un volumen equivalente (v/v) de fenol saturado, se mezcló por inversión manual, durante 10 min. , hasta obtener una emulsión completa.
- b) Se centrifugó durante 10 min. a 3,000 rpm/4°C, se tomó la fase superior y se pasó a un tubo limpio (evitando llevarse la interfase).
- c) Se realizó una segunda extracción con la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (v/v), repitiéndose el paso de centrifugación.
- d) La fase superior se pasó a un tubo limpio y se realizó la tercera extracción con la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (v/v), repitiendo las mismas condiciones.

5.3.4- PRECIPITACIÓN CON ETANOL ABSOLUTO.

La fase superior de la última extracción se pasó a un tubo limpio y se adicionó NaCl 3 M ó 5 M para obtener una concentración final de 60 mM, finalmente se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío a -20°C.

Se mezcló suavemente por inversión hasta que el DNA precipitó, el DNA flotante se recogió con la punta de una varilla de vidrio y se lavó 10 veces con etanol al 70% frío.

El DNA se dejó secar y se resuspendió en agua estéril manteniéndose en refrigeración o congelación hasta su uso.

5.4 EXTRACCIÓN DE DNA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN CON SALES.

Se aplicó este método en aquellas muestras donde se obtenía una cantidad de sangre mínima, se realizó el mismo procedimiento de lisis de células rojas, hasta obtener el botón de células blancas libre de hemoglobina.

El botón se resuspendió con 1 ml. del amortiguador de células rojas y se adicionaron al vial: 886 μ l de NaCl 5 mM, 46 μ l de SDS al 10%, se mezcló con vortex y se adicionó 308 μ l de NaCl saturado, se mezcló nuevamente y se centrifugó durante 15 min. a 11,000 rpm a 4°C. Después de centrifugar el sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se realizó el mismo método de extracción con fenol-cloroformo, a diferencia de la precipitación que se realizó con un volumen de isopropanol frío.

Se lavó el DNA con etanol al 70% dos veces, centrifugando entre cada una de las lavadas y eliminando el sobrenadante sin remover el botón de DNA. Se eliminó el exceso de etanol y se secó el DNA para ser resuspendido en agua estéril.

5.5 CUANTIFICACIÓN DEL DNA.

Se analizó el DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X (Tris base 0.089M, ácido bórico 0.089 M, EDTA, pH 8, 0.002 M), el corrimiento se realizó a 100 V por 30 min. Después de la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) y se analizó bajo luz UV.

Se cuantificó el DNA por espectrofotometría a 260 y 280 nm y se estableció la relación 260/280.

Se realizaron dos métodos de extracción de DNA dependiendo de la cantidad de sangre que se podía obtener, en general por ambos métodos se obtuvo DNA genómico de alto peso molecular, de buena calidad e integridad como se muestra en la Fig. 15. En promedio se obtuvo una concentración de 500 ng/ μ l y la relación 260/280 fue de 1.8, lo cual cumple con lo establecido en pureza para DNA genómico.

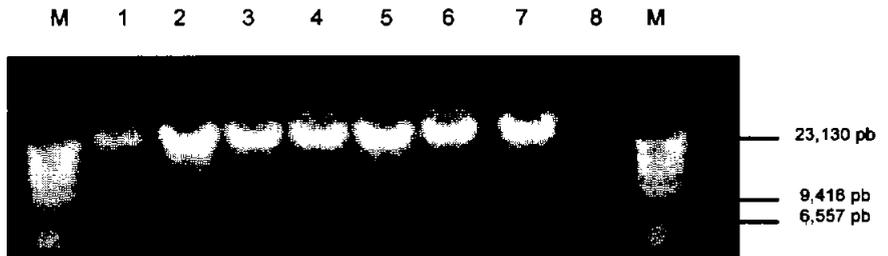


Fig. 15. Gel de agarosa al 1% muestra DNA genómico de alto peso molecular (carriles 1 al 8), extraído a partir de sangre periférica, comparado con el marcador (M) de peso molecular (DNA λ /Hind III, concentración 0.5 μ g/ μ l, donde se observa que la banda superior es de 23,130 pb).

5.6 DETERMINACIÓN DE LOS ALELOS DEL *GEN APOE* POR PCR.

Se amplificó DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), empleando los oligonucléotidos que flanquean el exón 4 del *gen Apo E* descritos por Emi y cols. (1988), con la siguiente secuencia:

F4 5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3'

F6 5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A-3'

Se realizó primero la amplificación de las secuencias ApoE que incluía los aminoácidos en la posición 112 y 158, esperándose un producto amplificado de 193 pb. El segundo paso fue la digestión del producto amplificado con la enzima de restricción Hha I que reconoce y corta el sitio (GCGC).

En la Fig. 16 se muestran los 6 sitios de corte, de esta manera se realizó la isotipificación de los fragmentos polimórficos de restricción (RFLPs) generados, que nos permitieron identificar los 6 genotipos que se producen por este método.

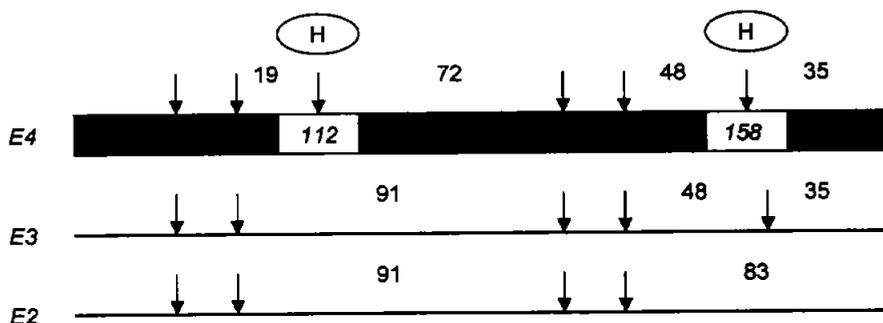


Fig. 16. Se muestra el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción HhaI en la posición 112 y 158 del exón 4 del *gen ApoE* y los diferentes fragmentos generados, cuya combinación da origen a 6 genotipos.

Se realizó la amplificación empleando la metodología descrita por Hixson y Vernier (1990), con modificaciones hechas en el laboratorio, para lo que fue necesaria la siguiente reacción:

| | | |
|--------------------------|------------|--------------|
| DNA genómico | 300-400 ng | 2.0 μ l |
| Oligonucleótido F4 | 200 ng | 2.0 μ l |
| Oligonucleótido F6 | 200 ng | 2.0 μ l |
| Amortiguador 10X | 1X | 3.0 μ l |
| Amplitaq (10 U/ μ l) | 2 U | 0.2 μ l |
| DMSO | 10% | 3.0 μ l |
| Agua cbp | 30 μ l | 17.8 μ l |

La mezcla de reacción se sometió al siguiente programa de PCR:

| | | | |
|----------------------------------|-------------|-----------------|--------------------|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 5 min. | |
| Desnaturalización | 94°C | 30 seg. | } 40 ciclos |
| Alineamiento | 60°C | 30 seg. | |
| Extensión | 70°C | 1.5 min. | |
| Extensión final | 70°C | 10 min. | |

5.7 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA.

Se realizó una cinética enzimática con 1, 3, 5, 10 y 15 U de la enzima de restricción Hha I, con la finalidad de establecer la cantidad de enzima necesaria para obtener una digestión completa del producto amplificado. De esta forma se estableció que con 3 U de enzima de restricción se obtiene un corte completo del producto amplificado, cuando se digieren a 37°C, durante 4 hrs.

5.8 ELECTROFÓRESIS EN GELES DE ACRILAMIDA.

Los productos amplificados y digeridos con la enzima de restricción Hha I, se resolvieron en geles de poliacrilamida no desnaturizante al 8%, durante 2.5 hrs. a 45 mA, flanqueando el gel con marcadores de peso molecular conocidos, marcador V (pBR322 DNA-Hae III) y VIII (pUCBM2 DNA-Hpa II+ pUCBM 21 DNA Dra I + Hind III) de ROCHE.

Después de la electrofóresis el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se analizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador. Se tomó fotografía del gel para su posterior análisis.

Los tamaños de los fragmentos se estimaron por comparación con los marcadores de peso molecular conocidos.

5.9 SECUENCIACIÓN.

Los productos amplificados fueron secuenciados para confirmar los cambios que modifican el sitio de restricción de la enzima HhaI, en la posición 112 y 158 de los 5 genotipos encontrados en las muestras analizadas, por lo que fue necesario purificar los productos amplificados empleando el kit QIAquick (QIAGEN) y el siguiente método:

- 1.- Se adicionaron 5 volúmenes de amortiguador PB por un volumen de reacción de PCR. Se mezcló antes de poner en la columna (150 μ l de amortiguador PB X 30 μ l de reacción de PCR).
- 2.- Se colocó la columna QIAquick en un tubo colector de 2 ml y se adicionó la mezcla del paso 1, para unir el DNA a la columna.
- 3.- Se centrifugó a 13,000 rpm / 30 - 60 seg.
- 4.- Se eliminó el sobrenadante y se colocó nuevamente la columna en el mismo tubo.
- 5.- Para lavar la columna, se adicionaron 0.75 ml del amortiguador PE y después se centrifugó a 13,000 rpm por 30 a 60 seg.
- 6.- Se eliminó el fluido y se puso nuevamente la columna sobre el mismo tubo, se centrifugó por un minuto a máxima velocidad para eliminar de esta forma restos de etanol.
- 7.- Se pasó la columna a un tubo nuevo de microcentrífuga previamente rotulado.
- 8.- Se eluyó el DNA de la columna adicionándole 50 μ l del amortiguador EB o agua estéril a pH: 7 – 8.5, en el centro de la columna y se centrifugó por un minuto para recuperar el DNA.

NOTA: Para incrementar la concentración de DNA se adicionaron únicamente 30 µl de buffer EB o agua, en el centro de la columna y se dejó reposar por un minuto, después se centrifugó bajo las mismas condiciones. Los productos purificados se analizaron en gel de agarosa al 3% en TBE1X.

5.9.1 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN.

1. Después de realizar la reacción de secuenciación los productos se purificaron para eliminar productos inespecíficos, por medio de columnas Centri-sep previa hidratación con 750 µl de agua estéril.
2. Se invirtieron varias veces las columnas y con ayuda del vortex se eliminaron las burbujas de aire en la columna.
3. Se dejaron en refrigeración durante 2 horas las columnas, para asegurar una hidratación completa, posteriormente se quitó el tapón inferior y el superior para eliminar el resto de agua.
4. Después se centrifugaron a 3,000 rpm durante un minuto para empaquetarlas y eliminar el resto de agua.
5. La reacción de secuenciación se colocó al centro de la columna y posteriormente se centrifugó a 3,000 rpm durante un minuto.
6. El producto purificado se secó por vacío (speed-vac) durante 45 min.
7. El producto seco se rehidrató con 16 µl de formamida ultrapura, se desnaturalizó y finalmente secuenciado (secuenciador de DNA automatizado ABI PRISM 3100).

VI. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

La frecuencia de los alelos se estimó usando el método de conteo génico y se determinó si la población control y de pacientes se encontraba en equilibrio de Hardy Weinberg.

La comparación de la frecuencia de los alelos entre los diferentes grupos se realizó usando la prueba de Chi-cuadrada (χ^2) y Exacta de Fisher según sea el caso.

Se calculó el razón de momios con un intervalo de confianza del 95% en individuos con 0, 1 ó 2 alelos ϵ_4 , empleando un método de regresión logística utilizando el paquete SPSS/PC y el programa EPI info V6.

VII. RESULTADOS

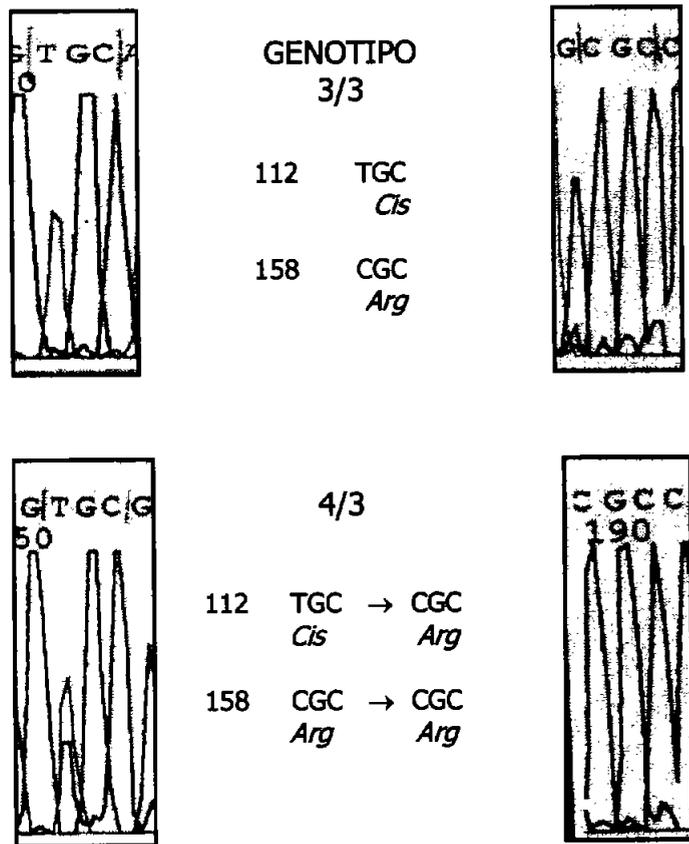


Fig. 17. Electroferogramas de los cambios de nucleótidos encontrados en los genotipos 3/3 y 4/3. Para el genotipo 3/3 se muestra la secuencia normal que codifica para cisteína y arginina en el codón 112 y 158. En el genotipo 4/3, se observa la sustitución de una timina por una citocina en el codon 112, lo que ocasionan el cambio del aminoácido cisteína por arginina.



3/2

112 TGC → TGC
Cis Cis

158 CGC → TGC
Arg Cis



4/4

112 TGC → CGC
Cis Arg

158 CGC → CGC
Arg Arg

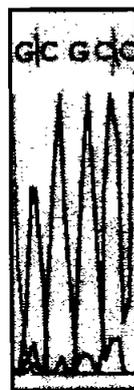


Fig. 18. Electroferogramas que muestran el cambio de una arginina por una cisteína en el codón 158 para el genotipo 3/2, dado por la sustitución de una C→T, mientras que en el genotipo 4/4, se observó la sustitución de una T→C en el codón 112, lo que ocasionan el cambio del aminoácido cisteína por arginina.

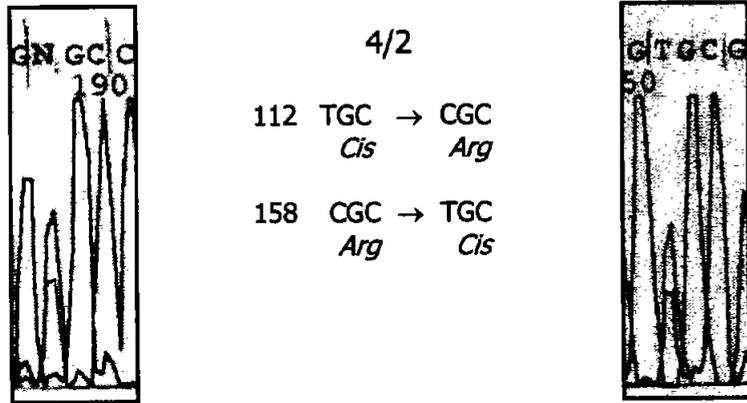


Fig. 19. Electroferograma que muestra los cambios observados en la posición 112 (T→C) de una arginina por una cisteína y en el residuo 158 (C→T), que ocasionan el cambio del aminoácido arginina por cisteína.

Estos cambios se confirmaron cuando los productos amplificados fueron digeridos con la enzima de restricción HhaI, debido a que estos cambios puntuales modifican el sitio de reconocimiento de la enzima generando diferentes fragmentos de restricción, lo que permitió se identificaran los diferentes genotipos (Fig. 20).

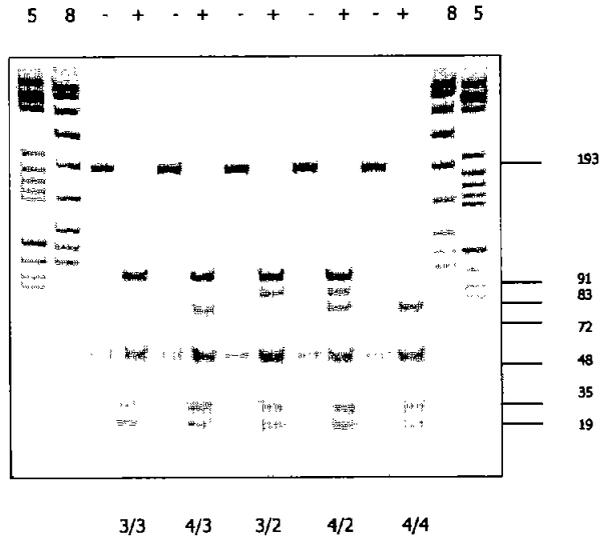


Fig. 20. Gel de poliacrilamida al 8%, donde se muestran después de la electrofóresis los fragmentos HhaI (+) para las diferentes isoformas apoE. Se identificaron individuos homocigotos 3/3 y 4/4 (líneas 4 y 12), así como los heterocigotos 4/3, 3/2 y 4/2 (líneas 6, 8 y 10), mostrándose los 5 genotipos encontrados en controles y en pacientes. El gel muestra los productos amplificados de 193 pb sin digerir (-), carriles 3, 5, 7 y 9. El tamaño de los fragmentos se determinó por los marcadores de peso molecular que flanquean el gel, marcador 5 (pBR322 DNA-Hae III) y marcador 8 (pUCBM2 DNA-Hpa II+ pUCBM 21 DNA Dra I + Hind III) de ROCHE.

Se determinaron las frecuencias genotípicas en los casos con EA, encontrándose los genotipos: 3/2, 4/2, 3/3, 4/3 y 4/4 como se muestra en la Tabla 8, al analizar la distribución gráfica de estas frecuencias se observó que el genotipo más frecuente fue el 3/3, seguido del 4/3 y 4/4 (Fig. 21).

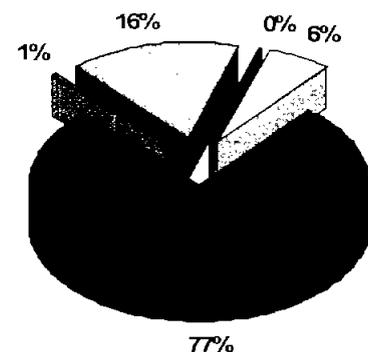
El análisis de los genotipos en los controles mostró que el más común también fue el 3/3, seguido del 4/3 y 3/2 solo encontramos un individuo homocigoto 4/4 y no se encontró ningún individuo homocigoto 2/2, en los grupos control y de casos con EA (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencias genotípicas en controles y casos con EA.

| GENOTIPOS APOE | <u>CONTROLES</u> | | <u>CASOS CON EA</u> | |
|-------------------|------------------|-------|---------------------|-------|
| | n | %* | n | %* |
| 2/2 | 0 | - | 0 | - |
| 3/2 | 18 | 5.21 | 1 | 1.16 |
| 4/2 | 2 | 0.57 | 1 | 1.16 |
| 3/3 | 227 | 80.28 | 48 | 55.81 |
| 4/3 | 47 | 13.62 | 33 | 38.37 |
| 4/4 | 1 | 0.28 | 3 | 3.48 |
| TOTAL | 345 | | 86 | |

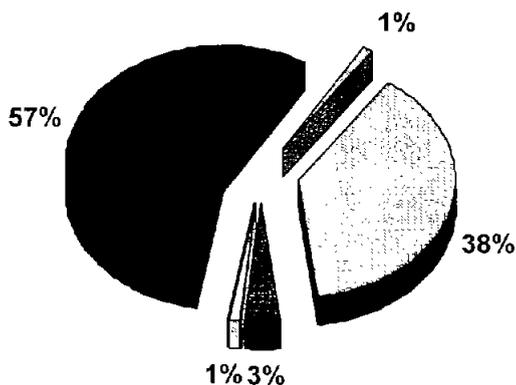
*Las frecuencias genotípicas se determinaron por conteo génico y se establecen en porcentaje.

GENOTIPOS APOE EN CONTROLES



■ 3,3 □ 4,2 □ 4,3 ■ 4,4 □ 3,2

GENOTIPOS APOE EN PACIENTES



■ 3,3 □ 4,2 □ 4,3 ■ 4,4 □ 3,2

Fig. 21. Se muestra la distribución de los genotipos encontrados en pacientes y controles, observándose que el genotipo 3/3 en ambos grupos es el de mayor frecuencia, mientras que la frecuencia del genotipo 4/4 es mayor en los pacientes con EA.

Sin embargo al comparar las frecuencias genotípicas entre los casos, se observó una mayor frecuencia del genotipo 3/3 en casos de inicio temprano, con una diferencia estadísticamente significativa (OR 3.025, IC 95% 1.14 a 8.08), en comparación con los casos de inicio tardío.

En el resto de los genotipos no se encontraron diferencias, debido al tamaño de la muestra o que no había genotipo comparativo, por lo que fue necesario separar los casos y las distribuciones de frecuencias en los diferentes grupos con sus correspondientes controles se muestran en la Tabla 9.

La distribución de genotipos ApoE en casos como en controles no difieren de los esperados ($p > 0.05$), por lo que ambas poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, para el sistema genético estudiado.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas en casos de inicio tardío y temprano, así como en controles.

| Genotipos APOE | Controles ≤65 años | | Casos con EA de Inicio temprano | | Controles ≥ 65 años | | Casos con EA de Inicio tardío | |
|----------------|-----------------------|-------|------------------------------------|-------|------------------------|-------|----------------------------------|-------|
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| 2/2 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - |
| 2/3 | 10 | 4.23 | 0 | - | 8 | 7.33 | 1 | 2.7 |
| 2/4 | 1 | 0.42 | 1 | 2.04 | 1 | 0.91 | 0 | - |
| 3/3 | 192 | 81.35 | 33 | 67.34 | 85 | 80.95 | 15 | 40.54 |
| 3/4 | 32 | 13.55 | 15 | 30.61 | 15 | 13.76 | 18 | 48.64 |
| 4/4 | 1 | 0.42 | 0 | - | 0 | - | 3 | 8.10 |
| TOTAL | 236 | | 49 | | 109 | | 37 | |

Las frecuencias alélicas fueron para el total de controles de 0.028 para el alelo $\epsilon 2$, 0.897 para $\epsilon 3$ y 0.073 para $\epsilon 4$, mientras que en el total de casos con EA fue de 0.011 para el alelo $\epsilon 2$, de 0.755 para $\epsilon 3$ y 0.232 para $\epsilon 4$.

La distribución de alelos se muestra en las gráficas de la Fig. 22, la frecuencia total del alelo $\epsilon 4$ en casos con EA (0.232) fue significativamente mayor sobre la muestra control (0.073) ($X^2_{\text{corrección de Yates}} 21.4, p=0.000004$).

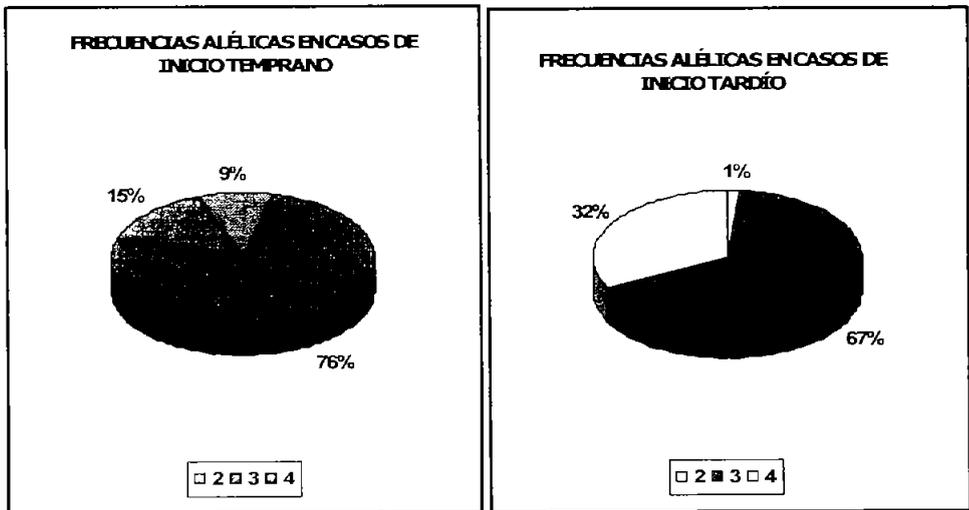


Fig. 22. Distribución de frecuencias alélicas en los casos de inicio temprano y tardío.

Se analizó si existía diferencia entre las diferentes formas de presentación de la enfermedad por lo que al comparar la frecuencia de los alelos Apo E entre casos de inicio temprano y controles pareados por sexo y edad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($X^2=2.85, p= 0.09$).

Al comparar la frecuencia de los alelos de Apo E en casos de inicio tardío con controles pareados por sexo y edad, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($X^2=7.81, p= 0.005$), como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Frecuencias alélicas en casos y controles pareados por sexo y edad.

| FRECUENCIAS EN: | n | $\epsilon-2$ | $\epsilon-3$ | $\epsilon-4$ | χ^2 |
|---------------------------------|----|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| <i>CASOS DE INICIO TARDÍO</i> | 37 | 0.013 | 0.662 | 0.324 | 7.81 p=0.005 |
| CONTROLES | 74 | 0.033 | 0.858 | 0.108 | |
| <i>CASOS DE INICIO TEMPRANO</i> | 49 | 0.10 | 0.826 | 0.163 | 2.85* p=0.09 |
| CONTROLES | 98 | 0.020 | 0.913 | 0.066 | |

* χ^2 corrección de Yates

Se determinó si el número de copias del alelo $\epsilon 4$ si se asocia a un riesgo mayor de padecer la enfermedad por lo que se calculó la Razón de Momios para casos de inició tardío y temprano, cuyos Odds Ratio (OR) de presentar EA se calcularon con un intervalo de confianza de 95% para sujetos con 0, 1, 2 y 1+2 copias del alelo $\epsilon 4$ (Tabla 11).

Tabla 11. Dosis génica del alelo $\epsilon 4$ y el sexo.

| Número de copias del alelo $\epsilon 4$ | | | | |
|---|---|--|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 1+2 |
| Mujeres con EA n=28 | 10 | 16 | 2 | 18 |
| Controles n=77 | 64 | 13 | 0 | 13 |
| OR (IC 95%) | 0.112 (0.039 a 0.332) p=0.000007 | 6.56 (2.26 a 19.05) p=0.00120 | 5.84 (0.287 a 349.3) p=0.172 | 8.86 (3.01 a 26.45) p=0.000007 |
| Hombres con EA n=9 | 6 | 2 | 1 | 3 |
| Controles n=32 | 29 | 3 | 0 | 3 |
| OR (IC 95%) | 0.206 (0.228 a 2.020) p=0.10 | 2.76 (0.19 a 28.56) p=0.24 | 3.85 (0.043 a 313.7) p=0.39 | 4.83 (0.49 a 43.7) p=0.10 |
| Total de Enfermos n=37 | 16 | 18 | 3 | 21 |
| Controles n=109 | 93 | 16 | 0 | 16 |
| OR (IC 95%) | 0.131 (0.052 a 0.329) p=0.000001 | 5.5 (2.19 a 13.75) p=0.000072 | 9.52 (0.723 a 504.66) p=0.05 | 7.62 (3.03 a 19.2) p=0.000001 |

Como se muestra en la tabla 11, el alelo $\epsilon 4$ confiere un riesgo sustancial para desarrollar la EA relacionado a la dosis o número de copias, por lo que la proporción de riesgo asociado con la EA y la posesión de 1 alelo $\epsilon 4$ fue de 5.5 (IC 95%, 2.19-13.75) y al poseer 2 copias, se incrementa el riesgo a 9.5 (IC 95%, 0.723-504.6), mientras que el riesgo sumado de 1+2 copias es de 7.62 (IC 95%, 3.03-19.2).

Se evaluó también si el riesgo era diferente entre mujeres y hombres, observándose que la presencia de un alelo $\epsilon 4$, en hombres es de 2.76, mientras que en los homocigotos es de 3.87. En el caso de las mujeres este riesgo es mayor por la presencia de 1 y 2 alelos $\epsilon 4$ comparado con los hombres (6.56 y 5.84 respectivamente).

En el caso de las mujeres la asociación combinada de homocigocidad y heterocigocidad del alelo $\epsilon 4$ fue casi el doble comparada con los hombres.

Al observarse que a mayor número de copias del alelo $\epsilon 4$ se incrementa el riesgo de padecer la EA, se trató de establecer si existía una relación con la edad de inicio y si había diferencias entre mujeres y hombres (Tabla 12).

La edad promedio de inicio de la enfermedad en los casos sin alelo $\epsilon 4$ fue de 72.1 años y en los casos con una copia de 70.7 años, mientras que en aquellos con 2 copias fue de 68.3 años, observando que disminuye la edad de inicio a medida que se incrementa en número de copias del alelo $\epsilon 4$, pero no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 12. Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, edad de inicio y número de copias del alelo $\epsilon 4$.

| Copias de $\epsilon 4$ | n | Edad promedio (DE) (años) |
|------------------------|----|------------------------------|
| Mujeres | | |
| 0 | 10 | 74.3 (5.44) ^{a,c} |
| 1 | 16 | 71.1 (2.96) ^{a,b} |
| 2 | 2 | 67.5 (3.54) ^{b,c} |
| Hombres | | |
| 0 | 6 | 68.5 (4.76) |
| 1 | 2 | 67.5 (2.12) |
| 2 | 1 | 70.0 (—) |
| Total | | |
| 0 | 16 | 72.1 (5.81) |
| 1 | 18 | 70.7 (3.06) |
| 2 | 3 | 68.3 (2.89) |

^a P=0.65 ^b P=0.13 ^c P=0.13

No fue evidente el promedio de edad de inicio de la enfermedad en hombres relacionado al número de alelos $\epsilon 4$, aunque sugiere que la edad de inicio tiende a ser más temprana en mujeres con este alelo. En el caso de las mujeres homocigotas para el alelo $\epsilon 4$, inician 6.8 años más temprano comparadas con aquellas sin alelo $\epsilon 4$, pero las diferencias no son significativas ($p=0.13$).

VIII. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El alelo 3 y el genotipo 3/3 fueron los más frecuentes en esta muestra de la población mexicana y nuestros resultados son semejantes a los encontrados en poblaciones caucásicas, afroamericanas, chinas, japonesas, hindúes e hispánicas. Al igual que en estas poblaciones le siguen en frecuencia los genotipos 4/3, 3/2 y 4/2 (Ganguli y cols., 2000; Hallman y cols., 1991).

La frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en esta muestra de población mexicana es baja de 0.073, comparada con otras poblaciones en que llega a ser de 0.11, pero es semejante a la reportada en chinos y japoneses lo cual es razonable dado el origen asiático de la población mexicana (Hong y cols., 1996; Kawamata y cols., 1994).

En México solo existe un estudio en población indígena maya, que reporta una frecuencia de fenotipos muy semejante a la de genotipos encontrada por nosotros, en la que no se encontraron tampoco alelos $\epsilon 2$, la frecuencia del alelo $\epsilon 3$ fue de 0.91 y la de $\epsilon 4$ de 0.09 (Kamboh y cols., 1991).

Estas pequeñas diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas encontradas pueden deberse a que la población estudiada por nosotros es mestiza (mezcla de indígena con español) como es la mayoría de la población mexicana, mientras que la muestra estudiada por Kamboh y cols., es indígena.

Existe otro estudio en población indígena nahua de nuestro grupo donde las frecuencias fueron para el alelo $\epsilon 3$ de 0.89, para el alelo $\epsilon 2$ de 0.01 y la de $\epsilon 4$ de 0.08 (Suastegui y cols., 2002), los cuales muestran resultados similares a los encontrados en este trabajo.

Al igual que lo reportado en un gran número de estudios la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ fue mayor en pacientes con EA de inicio tardío, por lo que puede considerarse que el alelo $\epsilon 4$ de ApoE es también un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad de Alzheimer en esta muestra de población mexicana estudiada (Maestre y cols., 1995; Saunders y cols., 1993b).

Se mostró que existe una tendencia inversa entre el número de alelos $\epsilon 4$ y la edad de inicio de la EA, a mayor número de copias del alelo $\epsilon 4$ menor edad de inicio, pero no alcanza significancia estadística.

En este trabajo se observa que los pacientes con una y dos copias del alelo $\epsilon 4$ tienen una edad de inicio menor que aquellos que no tienen el alelo $\epsilon 4$, habiendo diferencias entre hombres y mujeres. Esto puede deberse en parte a la mayor sobrevivencia de la mujer después de iniciada la demencia y a la alta prevalencia de EA en mujeres, pero también puede ser indicativo de una diferencia de género sobre el riesgo para desarrollar la EA. Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado por Payami y cols. (1996); Duara y cols. (1996).

A pesar de la evidente asociación entre alelo $\epsilon 4$ y la EA familiar y esporádica de inicio tardío pocos estudios han proporcionado una estimación del riesgo específico por sexo asociado con el alelo $\epsilon 4$. Los resultados sugieren que las mujeres necesitan solo una copia del alelo $\epsilon 4$, mientras que los hombres requieren 2 copias de este alelo para incrementar el riesgo de desarrollar la EA, sugiriendo una influencia de género, dando como resultado en la mujer un incremento en la susceptibilidad a la demencia.

Aunque la frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en los controles es baja, al compararla con la de los pacientes de inicio tardío resultó que es 4 veces mayor, de ahí la importancia de contar con controles con el mismo fondo genético que los pacientes.

En los chinos y japoneses, se piensa que la prevalencia de la EA es menor que la demencia por infartos múltiples, debido a la baja frecuencia del alelo $\epsilon 4$ en estas poblaciones, se ha sugerido como una de las causas (Hong y cols., 1996; Kawamata y cols., 1994).

En México no tenemos estudios epidemiológicos que nos permitan conocer la prevalencia de la EA y la demencia por infartos múltiples, por lo que resulta interesante investigarlas y ver si la baja frecuencia del alelo $\epsilon 4$ se correlaciona también con una frecuencia baja de EA.

Algunos estudios como el de Tang y cols. (1998), refieren que la presencia del alelo $\epsilon 4$ de ApoE es significativa en pacientes blancos con EA, pero no en afroamericanos e hispanos, en dicho estudio se refiere que el 84% de los individuos identificados como hispanos eran de origen caribeño y el resto de México y Centroamérica. Sabemos que los caribeños tienen un importante componente africano por lo que estos estudios erróneamente mezclan individuos que comparten el idioma, pero tienen diferente componente genético.

El gen ApoE, no es el gen primariamente causal pero es un factor de riesgo para desarrollar la EA en casos de inicio tardío y esto se ha demostrado en este estudio y en otros realizados en otras poblaciones, este efecto no se observa en familias de inicio temprano que presentan mutaciones en el gen de las presenilinas 1 y 2.

Es importante precisar las causas moleculares de este incremento en el riesgo de padecer la EA en individuos con alelos $\epsilon 4$, el cual está relacionado con su afinidad por el β -amiloide y su agregación, así como la subsiguiente formación de fibrillas que se incorporan dentro de las placas neuríticas.

La afinidad del alelo $\epsilon 2$ por el péptido amiloide es menor por lo que a este alelo se le confiere un efecto protector y un inicio más tardío (Corder y cols., 1994), el mecanismo por medio del cual se asocian estos alelos no es claro, sin embargo se cree que estos polimorfismos influyen en la producción, captación y distribución del péptido β -amiloide.

Finalmente, se ha sugerido que ApoE esta involucrada en la plasticidad sináptica durante la regeneración y reparación, siendo el alelo $\epsilon 4$ menos eficiente en este papel.

Se han descrito otros polimorfismos en diferentes genes, sin embargo ninguno de ellos han tenido resultados tan reproducibles, ni contundentes como el gen *ApoE*, que lo hace el mayor factor de riesgo genético para la EA de inicio tardío hasta el momento confirmado en diferentes poblaciones del mundo (Bertram y cols., 2004).

El alelo $\epsilon 4$ de ApoE es un factor de riesgo o susceptibilidad para desarrollar la EA, pero existe un acuerdo internacional en el que se especifica que no debe usarse como valor predictivo (American Collage of Medical Genetics, American Society of Human Genetics Working Group on ApoE and Alzheimer Disease, 1995; Post y cols., 1997; Relkin y cols., 1996).

IX. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El alelo $\epsilon 4$ del gen de la ApoE es un factor de riesgo para padecer la EA en pacientes de inicio tardío, siendo mayor en mujeres, pero no es necesario, ni suficiente para causarla.
2. En los casos de inicio tardío, las mujeres con el alelo $\epsilon 4$ tienen mayor riesgo de desarrollar la EA que los hombres.
3. En los casos de inicio tardío, se observó una tendencia a tener una edad de inicio más temprana mientras es mayor número de copias del alelo $\epsilon 4$ en el caso de las mujeres, no en los hombres.
4. La EA tiene una etiología compleja, varios factores de susceptibilidad genética se sumarán probablemente a otros factores ambientales aún desconocidos, para juntos producir este padecimiento.

X. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. 1996. **Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor.** *Science* 271:518-520.
- Adle-Biassette H, Duyckaerts C, Wasowicz M, He Y, Fomes P, Foncin JF, Lecomte D, Hauw JJ. 1996. **Beta AP deposition and head trauma.** *Neurobiol Aging* 17:415-419.
- Alberca R. 1998. **Enfermedad de Alzheimer y otras demencias.** Edit. Panamericana. España. Págs. 26:82-84, 150-176.
- Alonso ME, Gómez L, Otero E, Figueroa HH. 1989. **Importance of hereditary disease at a Neuropsychiatric Institute in Mexico City.** *Genet Epidemiol* 6:589-595.
- Alonso ME, Otero E, Martínez C. 1992. **Clinical and genetic aspects of a group of patients with Alzheimer's disease.** *J Tropic Geo Neurol* 2:27-31.
- Alonso ME, Yescas P. 1998. **Genética de la Enfermedad de Alzheimer.** *Rev Invest Clin* 50:155-162.
- Alzheimer's Disease Collaborative Group. 1995. **The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families.** *Nat Genet* 11:219-222.
- American College of Medical Genetics, American Society of Human Genetics Working Group on Apo E and Alzheimer disease. 1995. **Statement on use of apolipoprotein E testing for Alzheimer disease.** *JAMA* 20:1627-1629.

American Psychiatric Association. 1987. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Third Edition, Revised Washington, DC: American Psychiatric Association.

Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. 1992. **Structure and novel exons of the human tau gene**. *Biochemistry* 31:10626-10633.

Bachman L, Wolf A, Linn T, Knoefel E, Cobb L, Belanger J. 1993. **Incidence of dementia and probable Alzheimer's disease in a general population: The Framingham Study**. *Neurology* 43:515-519.

Bjarnadottir M, Wulff BS, Sameni M, Sloane BF, Keppler D, Grubb A, Abrahamson M. 1998. **Intracellular accumulation of the amyloidogenic L68Q variant of human cystatin C in NIH/3T3 cells**. *Mol Pathol* 51:317-326.

Balbin M, Grubb A, Abrahamson M. 1993. **An Ala/Thr variation in the coding region of the human cystatin C gene (CST3) detected as an SstII polymorphism**. *Hum Genet* 92:206-207.

Basun H, Corder EH, Guo Z, Lannfelt L, Corder LS, Manton KG, Winblad B, Viitanen M. 1996. **Apolipoprotein E polymorphism and stroke in a population sample aged 75 years or more**. *Stroke* 27:1310-1315.

Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. 1989. **The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein**. *Nature* 341:162-164.

Bertram L, Tanzi RE. 2004. **Alzheimer's disease: one disorder, too many genes?** *Hum Mol Genet* 13:135-141

Bertram L, Blacker D, Mullin K, Keeney D, Jones J, Basu S, Yhu S, McInnis MG, Go RC, Vekrellis K, Selkoe DJ, Saunders AJ, Tanzi RE. 2000. **Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q.** Science 290:2302-2303.

Bird TD, Lampe TH, Nemens EJ, Miner GW, Sumi SM, Schellenberg GD. 1988. **Familial Alzheimer's disease in American descendants of the Volga Germans: probable genetic founder effect.** Ann Neurol 23:25-31.

Bird TD, Sumi SM, Nemens EJ, Nochlin D, Schellenberg G, Lampe TH, Sadovnick A, Chui H, Miner GW, Tinkenberg J. 1989. **Phenotypic heterogeneity in familial Alzheimer's disease: a study of 24 kindreds.** Ann Neurol 25:12-25.

Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B Jr, Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE. 1998. **Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease.** Nat Genet 19:357-360.

Blesa R, Adroer R, Santacruz P, Ascaso C, Tolosa E, Oliva R. 1996. **High apolipoprotein E epsilon 4 allele frequency in age-related memory decline.** Ann Neurol 39:548-551.

Breitner JC, Wyse BW, Anthony JC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Norton MC, Tschanz JT, Plassman BL, Meyer MR, Skoog I, Khachaturian A. 1999. **APOE-epsilon4 count predicts age when prevalence of AD increases, then declines: the Cache County Study.** Neurology 53:321-331.

Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. 1981. **Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors.** Science 212:628-635.

Bruni AC, Montesi MP, Salmon D, Gei G, Perre J, el Hachimi KH, Foncin JF. 1992. **Alzheimer's disease: a model from the quantitative study of a large kindred.** J Geriatr Psychiatry Neurol 5:126-131.

Cai XD, Golde TE, Younkin SG. 1993. **Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor.** Science 259:514-516.

Castelli P, Campillo C, Nicolini H, Sosa AL. 1998. **Estudio de la Asociación genética de la apolipoproteína E con la longevidad, el deterioro cognoscitivo y la demencia.** Salud Mental 21:43-49.

Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, Winblad B, Venizelos N, Lannfelt L, Selkoe DJ. 1994. **Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation.** Proc Natl Acad Sci U S A 91:11993-11997.

Cooper J, Bloom F, Roth R. 2003a. **Acetylcholine in the Biochemical Bases of Neuropharmacology.** Eighth edition. Oxford University Press; Cap.7:151-223.

Cooper J, Bloom F, Roth R. 2003b. **Treating Neurological and Psychiatry Diseases In the Biochemical Bases of Neuropharmacology.** Eighth edition. Oxford University Press; Cap.7:151-223.

Corder EH, Basun H, Libius L, Corder S, Vütanen M, Winblad B, Lannfelt L. 1996a. **Alzheimer's disease risk in relation to α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E polymorphism in very old adults age 75+.** Alzheimer's Research 2:51-54.

Corder EH, Lannfelt L, Viitanen M, Corder L, Manton K, Winblad B, Basun H. 1996b. **Apolipoprotein E genotype in the prediction of cognitive decline and dementia in a prospectively studied elderly population.** *Dementia* 7:169-174.

Corder EH, Lannfelt L, Viitanen M, Corder LS, Manton KG, Winblad B, Basun H. 1996c. **Apollipoprotein E genotype determines survival in the oldest old (85 years or older) who have good cognition.** *Arch Neurol* 53:418-422.

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmader KE, et al. 1994. **Protective effect of apollipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease.** *Nat Genet* 7:180-184.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. 1993. **Gene dose of apollipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.** *Science* 261:921-923.

Crawford FC, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartman R, Krivian K, Morris MD, Richards D, Duara R, Anand R, Mullan MJ. 2000. **A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease.** *Neurology* 55:763-768.

Cruts M, Hendriks L, Van Broeckhoven C. 1996. **The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology.** *Hum Mol Genet* 58:1449-1455

Cummings JL, Cole G. 2002. **Alzheimer disease.** *JAMA* 287:2335-2338.

Czech C, Tremp G, Pradier L. 2000. **Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanism.** *Prog Neurobiol* 60:363-384.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, et al. 1991a. **Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene.** Nature 353:844-846.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Hamandi K, Mullan M, Goate A, Hardy J, Backhovens H, Martin JJ, Broeckhoven CV. 1991b. **Screening for the beta-amyloid precursor protein mutation (APP717: Val-Ile) in extended pedigrees with early onset Alzheimer's disease.** Neurosci Lett 129:134-135.

Chui HC, Teng EL, Henderson VW, Moy AC. 1985. **Clinical subtypes of dementia of the Alzheimer type.** Neurology 35:1544-1550.

Dal Forno G, Rasmusson DX, Brandt J, Carson KA, Brookmeyer R, Troncoso J, Kawas CH. 1996. **Apolipoprotein E genotype and rate of decline in probable Alzheimer's disease.** Arch Neurol 53:345-350.

Deng J, Rudick V, Dory L. 1995. **Lysosomal degradation and sorting of apolipoprotein E in macrophages.** J Lipid Res 36:2129-2140.

Denis Mc Garry J. 1977. **Lipid Metabolism I: Utilization and storage of energy in lipid form** In Thomas M. Devlin. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Fourth Edition. Wiley-Liss; Cap. 9:361-443.

Donoviel DB, Hadjantonakis AK, Ikeda M, Zheng H, Hyslop PS, Bernstein A. 1999. **Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects.** Genes Dev 13:2801-2810.

Doraiswamy P. 2002. **Non cholinergic strategies for treating and preventing Alzheimer disease.** CNS Drugs 16:811-824.

Du Y, Dodel RC, Eastwood BJ, Bales KR, Gao F, Lohmuller F, Muller U, Kurz A, Zimmer R, Evans RM, Hake A, Gasser T, Oertel WH, Griffin WS, Paul SM, Farlow MR. 2000. **Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease.** *Neurology* 55:480-483.

Duara R, Barker WW, Lopez-Alberola R, Loewenstein DA, Grau LB, Gilchrist D, Sevush S, St George-Hyslop S. 1996. **Alzheimer's disease: interaction of apolipoprotein E genotype, family history of dementia, gender, education, ethnicity, and age of onset.** *Neurology* 46:1575-1579.

Duriez P, Fruchart JC. 1999. **High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I.** *Clin Chim Acta* 286:97-114.

Emi M, Fujiwara Y, Nakamura Y. 1993. **A primary genetic linkage map of 14 polymorphic loci for the short arm of human chromosome 8.** *Genomics* 15:530-534.

Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. 1988. **Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms.** *Genomics* 3:373-379.

Esler WP, Wolfe MS. 2001. **A portrait of Alzheimer secretases—new features and familiar faces.** *Science* 293:1449-1454.

Evans DA, Beckett LA, Field TS, Feng L, Albert MS, Bennett DA, Tycko B, Mayeux R. 1997. **Apolipoprotein E epsilon4 and incidence of Alzheimer disease in a community population of older persons.** *JAMA* 277:822-824.

Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO. 1989. **Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported.** *JAMA* 262:2551-2556.

Fraser PE, Yang DS, Yu G, Levesque L, Nishimura M, Arawaka S, Serpell LC, Rogaeva E, St George-Hyslop P. 2000. **Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease.** *Biochim Biophys Acta* 1502:1-15.

Friedman G, Fromm P, Sazbon L, Grinblatt I, Shochina M, Tsenter J, Babaev S, Yehuda B, Groswasser Z. 1999. **Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury.** *Neurology* 52:244-248.

Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengard JH, Salomaa V, Vartiainen E, Perola M, Boerwinkle E, Sing CF. 2000. **Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism.** *Am J Hum Genet* 67:881-900.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, et al. 1995. **Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein.** *Nature* 373:523-527.

Ganguli M, Chandra V, Kamboh MI, Johnston JM, Dodge HH, Thelma BK, Juyal RC, Pandav R, Belle SH, DeKosky ST. 2000. **Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease: The Indo-US Cross-National Dementia Study.** *Arch Neurol* 57:824-830.

Genest J Jr, Marcil M, Denis M, Yu L. 1999. **High density lipoproteins in health and in disease.** *J Investig Med* 47:31-42

Glenner GG, Wong CW. 1984a. **Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 122:1131-1135.

Glenner GG, Wong CW. 1984b. **Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra I, Haynes A, Irving N, James L, et al. 1991. **Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease.** *Nature* 349:704-706.

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. 1989. **Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.** *Neuron* 3:519-526.

Goldberg J Ira. 1996. **Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis.** *J Lipid Res* 37:693-707

Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. 1987. **Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease.** *Science* 235:877-880.

Goldstein FC, Ashley AV, Gearing M, Hanfelt J, Penix L, Freedman LJ, Levey AI. 2001. **Apolipoprotein E and age at onset of Alzheimer's disease in African American patients.** *Neurology* 57:1923-1925.

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. 1985. **Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system.** *Annu Rev Cell Biol* 1:1-39.

Gómez-Isla T, Wasco W, Pettingell WP, Gurubhagavatula S, Schmidt SD, Jondro PD, McNamara M, Rodes LA, DiBlasi T, Growdon WB, Seubert P, Schenk D, Growdon JH, Hyman BT, Tanzi RE. 1997. **A novel presenilin-1 mutation: increased beta-amyloid and neurofibrillary changes.** *Ann Neurol* 41:809-813.

Gómez L, Alonso ME, Figueroa HH, Escobar A. 1986. **Enfermedad de Alzheimer presentación de 7 casos en 3 familias.** Rev Invest Clin 38:261-267.

Gómez-Isla T, Growdon WB, McNamara MJ, Nochlin D, Bird TD, Arango JC, Lopera F, Kosik KS, Lantos PL, Cairns NJ, Hyman BT. 1999. **The impact of different presenilin 1 and presenilin 2 mutations on amyloid deposition, neurofibrillary changes and neuronal loss in the familial Alzheimer's disease brain: evidence for other phenotype-modifying factors.** Brain 122:1709-1719.

Gómez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ, Perls TT, Lipsitz LA, Hyman BT. Gómez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ, Perls TT, Lipsitz LA, Hyman BT. 1996. **Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease.** Ann Neurol 39:62-70.

Goudsmit J, White BJ, Weitkamp LR, Keats BJ, Morrow CH, Gajdusek DC. 1981. **Familial Alzheimer's disease in two kindreds of the same geographic and ethnic origin. A clinical and genetic study.** J Neurol Sci 49:79-89.

Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, Kokoris GJ, Takis C, Kanter DS, Kase CS, Pessin MS. Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, Kokoris GJ, Takis C, Kanter DS, Kase CS, Pessin MS. 1996. **Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy.** Stroke 27:1333-1337.

Growdon JH, Locascio JJ, Corkin S, Gómez-Isla T, Hyman BT. 1996. **Apolipoprotein E genotype does not influence rates of cognitive decline in Alzheimer's disease.** Neurology 47:444-448.

Haan J, Maat-Schieman ML, van Duinen SG, Jensson O, Thorsteinsson L, Roos RA. 1994. **Co-localization of beta/A4 and cystatin C in cortical blood vessels in Dutch, but not in Icelandic hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis.** *Acta Neurol Scand* 89:367-371.

Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A, Utermann G. 1991. **The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations.** *Am J Hum Genet* 49:338-349.

Hardy J, Selkoe DJ. 2002. **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.** *Science* 297:353-356.

Havel RJ, Fielding CJ, Olivecrona T, Shore VG, Fielding PE, Egelrud T. 1973. **Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources.** *Biochemistry* 12:1828-1833.

Havel RJ, Kane J. Structure and metabolism of plasma lipoproteins en Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D. 1995. **The metabolic and molecular bases of inherited disease.** Seventh edition. Mc Grow Hill; Cap. 56:1841-1851.

Helbecque N, Richard F, Neuman E, Guez D, Levy R, Amougel P. 1996. **Interaction between α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E gene polymorphisms in the risk of Alzheimer's disease.** *Alzheimer's Research* 2:149-152.

Heston LL, Mastri AR, Anderson VE, White J. 1981. **Dementia of the Alzheimer type. Clinical genetics, natural history, and associated conditions.** *Arch Gen Psychiatry* 38:1085-1090.

Hixson JE, Vernier DT. 1990. **Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI.** J Lipid Res 31:545-548.

Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K. 1998. **Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes.** Nat Med 4:97-100.

Holtzman DM, Mobley WC. 1991. **Molecular studies in Alzheimer's disease.** Trends Biochem Sci 16:140-144.

Hong CJ, Liu TY, Liu HC, Wang SJ, Fuh JL, Chi CW, Lee KY, Sim CB. 1996. **Epsilon 4 allele of apolipoprotein E increases risk of Alzheimer's disease in a Chinese population.** Neurology 46:1749-1751.

Hutton M, Hardy J. 1997. **The presenilins and Alzheimer's disease.** Hum Mol Genet 6:1639-1646.

Kachaturian SV. 1985. **Diagnosis of Alzheimer's disease.** Arch Neurol 42:1097-105.

Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D. 1997. **Longitudinal study of the effect of apolipoprotein e4 allele on the association between education and cognitive decline in elderly men.** BMJ 314:34-35.

Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. 1995a. **APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by alpha1-antichymotrypsin polymorphism.** Nat Genet 10:486-488.

Kamboh MI. 1995b. **Apolipoprotein E polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease.** Hum Biol 67:195-215.

Kamboh MI, Weiss KM, Ferrell RE. 1991. **Genetic studies of human apolipoproteins. XVI. APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico.** Clin Genet 39:26-32.

Katzman R. 1986. **Alzheimer's disease.** N Engl J Med 314:964-973.

Kawamata J, Tanaka S, Shimohama S, Ueda K, Kimura J. 1994. **Apolipoprotein E polymorphism in Japanese patients with Alzheimer's disease or vascular dementia.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 57:1414-1416.

Kehoe PG, Williams H, Holmans P, Wilcock G, Cairns NJ, Neal J, Owen MJ. 1998. **The butyrylcholinesterase K variant and susceptibility to Alzheimer's disease.** J Med Genet 35:1034-1035.

Koster MN, Dermaut B, Cruts M, Houwing-Duistermaat JJ, Roks G, Tol J, Ott A, Hofman A, Munteanu G, Breteler MM, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. 2000. **The alpha2-macroglobulin gene in AD: a population-based study and meta-analysis.** Neurology 55:678-684.

Kostyszyn B, Cowburn RF, Seiger A, KJ/Eldgaard A, Sundstrom E. 2001. **Expression of presenilin 1 and Notch-1 receptor in human embryonic CNS.** Neuroscience 103:885-898.

Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK. 1995. **LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation.** Cell 82:331-340.

Kowal R, Herz J, Goldstein L, Esser U, Brown M. 1989. **Low density lipoprotein receptor related protein mediates lipoproteins.** Proc Natl Aca Sci USA 86:5810.

Kwiterovich PO Jr. 2002a. **Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity.** Am J Cardiol 90:30i-47i.

Kwiterovich PO Jr. 2002b. **Lipoprotein heterogeneity: diagnostic and therapeutic implications.** Am J Cardiol 90:1i-10i.

LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE. 1994. **Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid.** J Biol Chem 269:23403-23406.

Lai F, Williams RS. 1989. **A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome.** Arch Neurol 46:849-853.

Lambert G, Chase MB, Dugi K, Bensadoun A, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. 1999. **Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1.** J Lipid Res 40:1294-1303.

Lannfelt L, Axelman K, Lilius L, Basun H. 1995. **Genetic counseling in a Swedish Alzheimer family with amyloid precursor protein mutation.** Am J Hum Genet 56:332-335.

Lannfelt L, Lilius L, Nastase M, Viitanen M, Fratiglioni L, Eggertsen G, Berglund L, Angelin B, Linder J, Winblad B. 1994. **Lack of association between apolipoprotein E allele epsilon 4 and sporadic Alzheimer's disease.** Neurosci Lett 169:175-178.

Lehninger A, Nelson D, Cox M. 1993a. **Lipids Biosynthesis.** Principles of Biochemistry. Second Edition. Worth Publisher; Cap. 20:642-687.

Lehninger A, Nelson D, Cox M. 1993b. **Lipids.** Principles of Biochemistry. Second Edition. Worth Publisher; Cap. 9:240-267.

Lehninger A, Nelson D, Cox M. 1993c. **Oxidation of fatty Acids.** Principles of Biochemistry. Second Edition. Worth Publisher, Cap. 16:479-505.

Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. 1997. **Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease.** Hum Mol Genet 6:1933-1936.

Lendon CL, Ashall F, Goate AM. 1997. **Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics.** JAMA 277:825-831.

Levy-Lahad E, Lahad A, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD. 1995a. **Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease.** Ann Neurol 38:678-680.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. 1995b. **Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus.** Science 269:973-977.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. 1995c. **A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1.** Science 269:970-973.

Liao A, Nitsch RM, Greenberg SM, Finckh U, Blacker D, Albert M, Rebeck GW, Gomez-Isla T, Clatworthy A, Binetti G, Hock C, Mueller-Thomsen T, Mann U, Zuchowski K, Beisiegel U, Staehelin H, Growdon JH, Tanzi RE, Hyman BT. 1998. **Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease.** Hum Mol Genet 7:1953-1956.

Leo A, Blesa R, Gendre J, Castellvi M, Pastor P, Queralt R, Oliva R. 2001. **A novel presenilin 2 gene mutation (D439A) in a patient with early-onset Alzheimer disease.** Neurology 57:1926-1928.

Lleo A, Blesa R, Queralt R, Ezquerra M, Molinuevo JL, Peña-Casanova J, Rojo A, Oliva R. 2002. **Frequency of mutations in the presenilin and amyloid precursor protein genes in early-onset Alzheimer disease in Spain.** Arch Neurol 59:1759-1763.

Luo CC, Li WH, Moore MN, Chan L. 1986. **Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family.** J Mol Biol 187:325-340.

Maestre G, Ottman R, Stern Y, Gurland B, Chun M, Tang MX, Shelanski M, Tycko B, Mayeux R. 1995. **Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: ethnic variation in genotypic risks.** Ann Neurol 37:254-259.

Mahley R, Rall S. 1995. **Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The role of Apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism.** Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Seventh Edition. Mc Grow Hill Book Co., New York. Cap.61:1953-1980.

Mahley R. 1986. **Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.** Science 240:622-638.

Mak YT, Chiu H, Woo J, Kay R, Chan YS, Hui E, Sze KH, Lum C, Kwok T, Pang CP. 1996. **Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease in Hong Kong elderly Chinese.** Neurology 46:146-149.

Mandelkew EM, Mandelkew E. 1998. **Tau in Alzheimer's disease.** Trends Cell Biol 8:425-427.

Mann A, Iwatsubo T, Cairns N. 1995. **Amyloid β Protein (A β) Deposition in Chromosome 14 linked Alzheimer's disease.** Nature 375:754-760.

Matthijs G, Marynen P. 1998. **A deletion polymorphism in the human alpha-2-macroglobulin (A2M) gene.** Nucleic Acid Res 19:5102.

Mayeux R, Ottman R, Maestre G, Ngai C, Tang MX, Ginsberg H, Chun M, Tycko B, Shelanski M. 1995. **Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease.** *Neurology* 45:555-557.

Mayeux R, Stern Y, Spanton S. 1985. **Heterogeneity in dementia of the Alzheimer type: evidence of subgroups.** *Neurology* 35:453-461.

McCarron MO, Muir KW, Weir CJ, Dyker AG, Bone I, Nicoll JA, Lees KR. 1998. **The apolipoprotein E epsilon4 allele and outcome in cerebrovascular disease.** *Stroke* 29:1882-1887.

McIlroy SP, Crawford VL, Dynan KB, McGleenon BM, Vahidassr MD, Lawson JT, Passmore AP. 2000. **Butyrylcholinesterase K variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland.** *J Med Genet* 37:182-185.

McGeer PL, McGeer EG. 2001. **Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease.** *Arch Neurol* 58:1790-1792.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 1984. **Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease.** *Neurology* 34:939-944.

Mena R, García F. 1998. **Bases neuropatológicas y moleculares de la enfermedad de Alzheimer.** *Arch Neurosc* 3:164-173.

Millichap D, Oliver C, Maquillan S, Kalsy S, Lloyd V, Hall S. 2003. **Descriptive functional analysis of behavioral excesses shown by adults with Down syndrome and dementia.** *Int J Geriatr Psychiatry* 18:844-854.

Mitchell CD, King WC, Applegate KR, Forte T, Glomset JA, Norum KR, Gjone E. 1980. **Characterization of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency.** J Lipid Res 21:625-34.

Miller A, Dykes D, Polesky F. 1988. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nucleic Acid Res 16:1215.

Millichap D, Oliver C, McQuillan S, Kalsy S, Lloyd V, Hall S. 2003. **Descriptive functional analysis of behavioral excesses shown by adults with Down syndrome and dementia.** Int J Geriatr Psychiatry 18:844-854.

Mirra SS, Murrell JR, Gearing M, Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Levey AI, Jones R, Green J, Shoffner JM, Wainer BH, Schmidt ML, Trojanowski JQ, Ghetti B. 1999. **Tau pathology in a family with dementia and a P301L mutation in tau.** J Neuropathol Exp Neurol. 58:335-345.

Mullan M, Houlden H, Windelspecht M, Fidani L, Lombardi C, Diaz P, Rossor M, Crook R, Hardy J, Duff K. 1992. **A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene.** Nat Genet 2:340-342.

Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. 1991. **A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease.** Science 254:97-99.

Muros M, Rodríguez-Ferrer C. 1996. **Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4.** Atherosclerosis 121:13-21.

Murrell JR, Koller D, Foroud T, Goedert M, Spillantini MG, Edenberg HJ, Farlow MR, Ghetti B. 1997. **Familial multiple-system tauopathy with presenile dementia is localized to chromosome 17.** *Am J Hum Genet* 61:1131-1138.

Myers RH, Schaefer EJ, Wilson PW, D'Agostino R, Ordovas JM, Espino A, Au R, White RF, Knoefel JE, Cobb JL, McNulty KA, Beiser A, Wolf PA. 1996. **Apolipoprotein E epsilon4 association with dementia in a population-based study: The Framingham study.** *Neurology* 46:673-677.

Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. 1994. **Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro.** *Science* 26:850-852.

Nee L, Polinsky R, Eldridge R, Weingartner H, Smallberg S, Ebert M. 1993. **A family with histological confirmed Alzheimer's disease.** *Arch Neurol* 40:203-208.

Nussbaum RL, Ellis CE. 2003. **Alzheimer's disease and Parkinson's disease.** *N Engl J Med* 348:1356-1364.

Okuizumi K, Onodera O, Namba Y, Ikeda K, Yamamoto T, Seki K, Ueki A, Nanko S, Tanaka H, Takahashi H. 1995. **Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease.** *Nat Genet* 11:207-209.

Okuizumi K, Onodera O, Seki K, Tanaka H, Namba Y, Ikeda K, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Tsuji S. 1996. **Lack of association of very low density lipoprotein receptor gene polymorphism with Caucasian Alzheimer's disease.** *Ann Neurol* 40:251-254.

Payami H, Montee KR, Kaye JA, Bird TD, Yu CE, Wijsman EM, Schellenberg GD. 1994. **Alzheimer's disease, apolipoprotein E4, and gender.** *JAMA* 271:1316-1317.

Payami H, Zarepari S, Montee KR, Sexton GJ, Kaye JA, Bird TD, Yu CE, Wijsman EM, Heston LL, Litt M, Schellenberg GD. 1996. **Gender difference in apolipoprotein E-associated risk for familial Alzheimer disease: a possible clue to the higher incidence of Alzheimer disease in women.** Am J Hum Genet 58:803-811.

Pérez-Tur J. **La genética y la Enfermedad de Alzheimer.** 2000. Rev Neurol 30:161-169.

Pérez-Tur J. 2001. **Presenilins in the genesis of Alzheimer's disease.** Rev Neurol 33:967-972.

Pericak-Vance MA, Haines JL. 1995. **Genetic susceptibility to Alzheimer disease.** Trends Genet 11:504-508.

Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HA, Menold MM, Conneally PM, Small GW, Vance JM, Saunders AM, Roses AD, Haines JL. 1997. **Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12.** JAMA 278:1237-1241.

Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA. 1991. **Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage.** Am J Hum Genet 48:1034-1050.

Perret B, Mabile L, Martinez L, Terce F, Barbaras R, Collet X. 2002. **Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation.** J Lipid Res 43:1163-1169.

Plassman BL, Breitner JC. 1996. **Apolipoprotein E and cognitive decline in Alzheimer's disease.** Neurology 47:317-320.

Ponting CP, Hutton M, Nyborg A, Baker M, Jansen K, Golde TE. 2002. **Identification of a novel family of presenilin homologues.** Hum Mol Genet 11:1037-1044.

Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM. 1995. **Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease.** Proc Natl Acad Sci U S A 92:12260-12264.

Poirier J. 1994. **Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease.** Trends Neurosci 17:525-530.

Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. 1993. **Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease.** Lancet 342:697-699.

Post SG, Whitehouse PJ, Binstock RH, Bird TD, Eckert SK, Farrer LA, Fleck LM, Gaines AD, Juengst ET, Karlinsky H, Miles S, Murray TH, Quaid KA, Relkin NR, Roses AD, St George-Hyslop PH, et al. 1997. **The clinical introduction of genetic testing for Alzheimer disease. An ethical perspective.** JAMA 277:832-836.

Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS. 1998. **Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models.** Annu Rev Genet 32:461-493.

Queralt R. 2000. **A novel mutation V89 in the presenilin 1 gene in a family with early onset Alzheimer's disease and marked behavioral disturbances.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 72:266-269.

Qian S, Jiang P, Guan XM, Singh G, Trumbauer ME, Yu H, Chen HY, Van de Ploeg LH, Zheng H. 1998. **Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates A β 1-42/43 expression.** Neuron 20:611-617.

Rao VS, Cupples A, van Duijn CM, Kurz A, Green RC, Chui H, Duara R, Auerbach SA, Voliccr L, Wells J, van Broeckhoven C, Growdon JH, Haines JL, Farrer LA. 1996. **Evidence for major gene inheritance of Alzheimer disease in families of patients with and without apolipoprotein E epsilon 4.** Am J Hum Genet 59:664-675.

Ray WJ, Ashall F, Goate AM. 1998. **Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease.** Mol Med Today 4:151-157.

Rebeck GW, Reiter JS, Strickland DK, Hyman BT. 1993. **Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions.** Neuron 11:575-580.

Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS, Chen K, Bandy D, Minoshima S, Thibodeau SN, Osborne D. 1996. **Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E.** N Engl J Med 334:752-758.

Relkin NR, Kwon YJ, Tsai J, Gandy S. 1996. **The National Institute on Aging/Alzheimer's Association recommendations on the application of apolipoprotein E genotyping to Alzheimer's disease.** Ann N Y Acad Sci 802:149-176.

Rocca WA, Amaducci LA, Schoenberg BS. 1986. **Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease.** Ann Neurol 19:415-424.

Rogaev EI, Sherrington R, Wu C, Levesque G, Liang Y, Rogaeva EA, Ikeda M, Holman K, Lin C, Lukiw WJ, de Jong PJ, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop P. 1997. **Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease.** Genomics 40:415-424.

- Rogers J. 2000. **An IL-1 alpha susceptibility polymorphism in Alzheimer's disease: new fuel for the inflammation hypothesis.** *Neurology* 55:464-465.
- Rosenberg RN. 2000. **The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture.** *Neurology* 54:2045-2054.
- Roses AD. 1994. **Apolipoprotein E is a relevant susceptibility gene that affects the rate of expression of Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 15 Suppl 2:S165-167.
- Russell W. 1999. **Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism.** *Cell* 97:539-542.
- Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M, Teller JK. 2001. **Molecular consequences of presenilin1 mutation.** *Nature* 411:654-655.
- Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M, Teller JK. 2000. **Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease.** *Nature* 405:531-532.
- Sahota A, Yang M, Gao S, Hui SL, Baiyewu O, Gureje O, Oluwole S, Ogunniyi A, Hall KS, Hendrie HC. 1997. **Apolipoprotein E-associated risk for Alzheimer's disease in the African-American population is genotype dependent.** *Ann Neurol* 42:659-661.
- Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** 2nd Ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, B 24.
- Sanchez P, Alvarez V, Avila J. 2001. **La proteína Tau en enfermedades neurodegenerativas. Tautopatías.** *Rev Neurol* 33:169-177.

Saunders AM, Schmechel K, Breitner JC, Benson MD, Brown WT, Goldfarb L, Goldgaber D, Manwaring MG, Szymanski MH, McCown N. 1993a. **Apolipoprotein E epsilon 4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases.** Lancet 342:710-711.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ. 1993b. **Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease.** Neurology 43:1467-1472.

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME. 1992. **Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14.** Science 258:668-671.

Schellenberg GD. 1995. **Progress in Alzheimer's disease genetics.** Curr Opin Neurol 8:262-267.

Scheper W, Zwart R, Sluijs P, Annaert W, Gool WA, Baas F. 2000. **Alzheimer's presenilin 1 is a putative membrane receptor for rab GDP dissociation inhibitor.** Hum Mol Genet 9:303-310.

Selkoe DJ. 1991. **Amyloid protein and Alzheimer's disease.** Sci Am 265:68-78.

Shen Y, Lookene A, Nilsson S, Olivecrona G. 2002. **Functional analyses of human apolipoprotein CII by site-directed mutagenesis: identification of residues important for activation of lipoprotein lipase.** J Biol Chem 277:4334-4342.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K. 1995. **Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease.** *Nature* 375:754-760.

Sisodia SS, Kim SH, Thinakaran G. 1999. **Function and dysfunction of the presenilins.** *Am J Hum Genet* 65:7-12.

Sjögren T, Sjögren H, Lindgren AG. 1952. **Morbus Alzheimer and morbus Pick; a genetic, clinical and patho-anatomical study.** *Acta Psychiatr Neurol Scand* 82:1-152.

Slooter AJ, Tang MX, van Duijn CM, Stern Y, Ott A, Bell K, Breteler MM, Van Broeckhoven C, Tatemichi TK, Tycko B, Hofman A, Mayeux R. 1997. **Apolipoprotein E epsilon 4 and the risk of dementia with stroke. A population-based investigation.** *JAMA* 277:818-821.

Small BJ, Graves AB, McEvoy CL, Crawford FC, Mullan M, Mortimer JA. 2000. **Is APOE-epsilon4 a risk factor for cognitive impairment in normal aging?** *Neurology* 54:2082-2088.

Smith Mark A. 2002. **Amyloid- β and tau serve antioxidant functions in the aging and Alzheimer brain.** *Free Radical Biology Medicine* 33:1194-1199.

Sobel E, Louhija J, Sulkava R, Davanipour Z, Kontula K, Miettinen H, Tikkanen M, Kainulainen K, Tilvis R. 1995. **Lack of association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset Alzheimer's disease among Finnish centenarians.** *Neurology* 45:903-907.

Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Kirchgessner TG, Komaromy MC, Mohandas T, Schotz MC, Lusis AJ. 1987. **Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21.** *Genomics* 1:138-144.

Spence MA, Heyman A, Marazita ML, Sparkes RS, Weinberg T. 1986. **Genetic linkage studies in Alzheimer's disease.** *Neurology* 36:581-584.

Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Murrell JR, Farlow MR, Ghetti B. 1997. **Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments.** *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4113-4118.

St George-Hyslop P, Haines J, Rogaeve E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, Foncin JF, Montesi M, Bruni A, Sorbi S. 1992. **Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14.** *Nat Genet* 2:330-334.

St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D. 1987. **The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21.** *Science* 235:885-890.

St George-Hyslop PH. 2000. **Piecing together Alzheimer's.** *Sci Am* 283:76-83.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Huang D, Corder EH, Dong LM, Jakes R, Alberts MJ, Gilbert JR. 1994a. **Hypothesis: microtubule instability and paired helical filament formation in the Alzheimer disease brain are related to apolipoprotein E genotype.** *Exp Neurol* 125:163-171.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. 1994b. **Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11183-11186.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. 1993a. **Apollipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset famillal Alzheimer disease.** Proc Natl Acad Sci U S A 90:1977-1981.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. 1993b. **Binding of human apollipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: Isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease.** Proc Natl Acad Sci USA 90: 8098-8102.

Struhl G, Adachi A. 2000. **Requirements for presenilin-dependent cleavage of Notch and other transmembrane proteins.** Mol Cell 6:625-636.

Suastegui RA, Yescas P, Camacho JL, Ochoa A, Granados J, Jara A, López A, Alonso ME. 2002. **Frecuencia de la apollipoproteína E en una población Nahua.** Rev Invest Clin 54:415-421.

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. 1994. **An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by famillal amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants.** Science 264:1336-1340.

Tall AR. 1995a. **Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies.** J Intern Med 237:5-12.

Tall AR. 1995b. **Plasma lipid transfer proteins.** Annu Rev Biochem 64:235-257.

Tandon A, Rogaeva E, Mullan M, St George-Hyslop PH. 2000. **Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of beta-amyloid and the presenilins.** Curr Opin Neurol 13:377-384.

Tang MX, Cross P, Andrews H, Jacobs DM, Small S, Bell K, Merchant C, Lantigua R, Costa R, Stern Y, Mayeux R. 2001. **Incidence of AD in African-Americans, Caribbean Hispanics, and Caucasians in northern Manhattan.** *Neurology* 56:49-56.

Tang MX, Maestre G, Tsai WY, Liu XH, Feng L, Chung WY, Chun M, Schofield P, Stern Y, Tycko B, Mayeux R. 1996. **Relative risk of Alzheimer disease and age-at-onset distributions based on APOE genotypes among elderly African Americans, Caucasians, and Hispanics in New York City.** *Am J Hum Genet* 58:574-584.

Tang MX, Stern Y, Marder K, Bell K, Gurland B, Lantigua R, Andrews H, Feng L, Tycko B, Mayeux R. 1998. **The APOE-epsilon4 allele and the risk of Alzheimer disease among African Americans, whites, and Hispanics.** *JAMA* 279:751-755.

Teisberg P, Gjone E. 1974. **Probable linkage of LCAT locus in man to the alpha haptoglobin locus on chromosome 16.** *Nature* 249:550-551.

Tierney MC, Szalai JP, Snow WG, Fisher RH, Tsuda T, Chi H, McLachlan DR, St George-Hyslop PH. 1996. **A prospective study of the clinical utility of ApoE genotype in the prediction of outcome in patients with memory impairment.** *Neurology* 46:149-154.

Thorsteinsson L, Georgsson G, Asgeirsson B, Bjarnadottir M, Olafsson I, Jensson O, Gudmundsson G. 1992. **On the role of monocytes/macrophages in the pathogenesis of central nervous system lesions in hereditary cystatin C amyloid angiopathy.** *J Neurol Sci* 108:121-128.

Trigatti B, Rigotti A, Krieger M. 2000. **The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism.** *Curr Opin Lipidol* 11:123-131.

Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC, Smith GE, Schaid DJ, Kokmen E, Ivnik RJ, Thibodeau SN. 1994. **Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease.** *Am J Hum Genet* 54:643-649.

Utermann G. 1995. **Lipoprotein (a).** Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D. **The metabolic and molecular bases of Inherited disease.** Seventh edition Mc Grow Hill; Cap.58:1887-1912.

van Duijn CM, de Knijff P, Cruts M, Wehnert A, Havekes LM, Hofman A, Van Broeckhoven C. 1994. **Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease.** *Nat Genet* 7:74-78.

van Duijn CM, Hendriks L, Farrer LA, Backhovens H, Cruts M, Wehnert A, Hofman A, Van Broeckhoven C. 1994. **A population-based study of familial Alzheimer disease: linkage to chromosomes 14, 19, and 21.** *Am J Hum Genet* 55:714-727.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, et al. 1999. **Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE.** *Science* 286:735-741.

Walden CC, Hegele RA. 1994. **Apolipoprotein E in hyperlipidemia.** *Ann Inter Med* 120:1026-1036.

Wang N, Arai T, Ji Y, Rinninger F, Tall AR. 1998. **Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice.** *J Biol Chem* 273:32920-32926.

Warwick Daw E, Payami H, Nemens EJ, Nochlin D, Bird TD, Schellenberg GD, Wijsman EM. 2000. **The number of trait loci in late-onset Alzheimer disease.** *Am J Hum Genet* .66:196-204.

Weitkamp LR, Nee L, Keats B, Polinsky RJ, Guttormsen S. 1983. **Alzheimer disease: evidence for susceptibility loci on chromosomes 6 and 14.** Am J Hum Genet 35:443-453.

Wernicke TF, Reischies FM. 1994. **Prevalence of dementia in old age: clinical diagnoses in subjects aged 95 years and older.** Neurology 44:250-253.

Wilhelmsen KC. 1997. **Frontotemporal dementia is on the MAPtau.** Ann Neurol 41:139-140.

Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY. 1985. **Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome.** Ann Neurol 12:278-282.

Wittenburg N, Eimer S, Lakowski B, Rohrig S, Rudolph C, Baumeister R. 2000. **Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in *C. elegans*.** Nature 406:306-309.

Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzei L, Fried G, Jovanovic JN, Seeger M, Relkin NR, Liao F, Cheder F, Buxbaum JD, Chait BT, Thinakaran G, Sisodia SS, et al. 1998. **Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides.** Nat Med 4:447-451.

Xu PT, Schmechel D, Rothrock-Christian T, Burkhart DS, Qiu HL, Popko B, Sullivan P, Maeda N, Saunders AM, Roses AD, Gilbert JR. 1996. **Human apolipoprotein E2, E3, and E4 isoform-specific transgenic mice: human-like pattern of glial and neuronal immunoreactivity in central nervous system not observed in wild-type mice.** Neurobiol 3:229-245.

Yeagle PL. 1985. **Cholesterol and the cell membrane.** *Biochim Biophys Acta* 822:267-287.

Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, Yu H, Yang DS, Holmes E, Milman P, Liang Y, Zhang DM, Xu DH, Sato C, Rogaev E, et al. 2000. **Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing.** *Nature* 47:48-54.

Zappia M, Manna I, Serra P, Cittadella R, Andreoli V, La Russa A, Annesi F, Spadafora P, Romeo N, Nicoletti G, Messina D, Gambardella A, Quattrone A. 2004. **Increased risk for Alzheimer disease with the interaction of MPO and A2M polymorphisms.** *Arch Neurol* 61:341-344.

Zerbin- Rudin E. 1969. **Enfermedad de Alzheimer, procesos de atrofia cerebral en PE.** Becker Ed. *Genetica Humana, Enfermedades Psiquiátricas.* Ediciones Toray, Barcelona. Pág. 111-126.