



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO**



**ANALISIS MOLECULAR DEL GEN PSEN-1 EN
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE
INICIO TEMPRANO**

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO GENETISTA:

P R E S E N T A :

OSCAR FRANCISCO CHACON CAMACHO



TUTOR: DR. CARLOS VENEGAS VEGA
ASESOR: QFB ELIZABETH RUIZ SANCHEZ



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Oscar y Ligia por su apoyo, confianza y creer en mi no sólo durante la residencia sino durante toda mi vida. Gracias por ser los padres más maravillosos y ser el ejemplo a seguir para un hijo. La vida me será corta y necesitare muchas más para pagarles todo el esfuerzo que han depositado en mi y mis hermanos. Gracias por sobre todas las cosas por darme amor, felicidad, alegría y enseñarme a ser una buena persona.

A mi hermana Ligia, mi cuñado Roberto y mis sobrinos Cinthia y Adrián por permitirme estar en su hogar para realizar mis estudios. Gracias por dejarme ser parte de su familia, por su apoyo y consejos en todo momento.

A todos mis hermanos: Juan Carlos, Luis y Kattia que siempre me han apoyado en mis estudios.

A la familia Granillo-Alvarez por adoptarme como a un hijo más y por apoyarme en mis momentos más difíciles. Gracias a mi novia "Pequitas Bonita" por proporcionarme tanto amor, cariño y felicidad; por estar conmigo en mis alegrías y tristezas, y por tener la capacidad de darme felicidad y consuelo en mi soledad; gracias por tus sabios consejos y ayuda durante la escritura y corrección de mi tesis.

A la Dra. Susana Kofman-Alfaro por permitirme ingresar a su casa el Servicio de Genética del Hospital General de México, lugar en donde he aprendido a ser mejor médico y persona.

A mi tutor el Dr. Carlos Venegas por aceptarme dentro del Proyecto de Tesis, por sus consejos, revisiones, enseñanzas y amistad.

A todo el personal del Servicio de Genética, en especial a la Maestra Alicia Cervantes por su dedicación, enseñanza, paciencia, consejos, por creer en los residentes y ser un ejemplo para nosotros.

A mis compañeros y amigos residentes por compartir las tristezas y alegrías, sin ellos la residencia no hubiera sido tan fructífera.

A la Dra. Victoria Campos y la Bióloga Marlene Alvarez por su apoyo en el laboratorio.

Al Servicio de Genómica, en especial a la Maestra en Ciencias Elijia Juárez T. por su colaboración en la secuenciación del DNA.

Un agradecimiento especial y de forma infinita a mi Maestra y amiga Elizabeth Ruiz Sánchez, gracias a su ayuda en laboratorio pude concluir con este proyecto de tesis. Gracias eternamente.

Por último: "gracias a la vida que me ha dado tanto"

"Siente que la vida es como un sueño,
como la hierba que crece en la mañana y
luego en la tarde es cortada y se seca"

INDICE

RESUMEN	1-2
1. MARCO TEORICO	
1.1. Antecedentes históricos	3-4
1.2. Epidemiología	5-6
1.3. Tipos de demencia y demencia tipo Alzheimer	7
1.4. Historia natural y características clínicas de la EA	8-10
1.5. Criterios clínicos diagnósticos para la EA	10
1.6. Neuropatología de la EA	11-16
1.6.1. Cambios macroscópicos	
1.6.2. Cambios microscópicos	
1.6.3. Métodos de diagnóstico neuropatológico	
1.7. Genética de la EA	17-37
1.7.1. Enfermedad de Alzheimer de tipo Familiar	
1.7.2. Enfermedad de Alzheimer de tipo Familiar de Inicio Temprano	
1.7.3. Proteína Precursora de Amiloide (PPA)	
1.7.4. Presenilinas	
1.7.4.1. Biología Molecular de las presenilinas	
1.7.4.2. Funciones de las presenilinas	
1.7.4.3. Mutaciones en las presenilinas	
1.7.4.4. Efecto de las mutaciones en presenilinas sobre A β 42	
1.8. Mecanismos de neurodegeneración en la EA	38
1.9. Diagnóstico diferencial	39-43
1.9.1. Enfermedad de Parkinson	

1.9.2. Demencia por Cuerpos de Lewy	
1.9.3. Demencia Frontotemporal	
1.9.4. Esclerosis Lateral Amiotrófica	
1.9.5. Enfermedad de Huntington	
1.9.6. Enfermedad de Creutzfeld-Jacob y otras enfermedades priónicas	
1.10. Estrategias de tratamiento basados en la biología del péptido A β	44-46
2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	47
3. OBJETIVO	48
4. DISEÑO DE ESTUDIO	48
4.1. Criterios de inclusión	
4.2. Criterios de exclusión	
5. MATERIAL Y METODOS	49-56
5.1. Procedimientos generales	
5.2. Extracción de DNA de sangre periférica	
5.2.1. Identificación de la muestra	
5.2.2 Procedimiento	
5.3. Análisis espectrofotométrico para cuantificación de DNA	
5.4. Condiciones generales de la reacción de PCR	
5.5. Técnica de electroforesis	
5.6. Purificación de templados para secuenciar	
5.7. Reacción de secuenciación	
5.8. Montaje de la muestra	
5.9. Análisis estadístico	
6. ASPECTOS ETICOS	56
7. RESULTADOS	57-69
8. DISCUSION	70-82

9.1. Criterios clínicos diagnósticos para la EA (DSM IV, NINCDS-ADRDA)

9.2. Minimental State Examination (MMSE)

9.3. Clinical Dementia Rating (CDR)

9.4. NINCDS-ADRDA

9.5. CERAD

9.6. Khachaturian

9.7. Braak y Braak

9.8. Sitios con mutación y polimorfismos dentro de la PPA

9.9. Estructura de la PPA y sus principales metabolitos

9.10. Sumario de actividades y funciones para la PPA

9.11. Sitios con mutación y polimorfismo dentro de la PSEN-1

9.12. Sitios con mutación y polimorfismo dentro de la PSEN-2

9.13. Procesamiento de la PPA y neurodegeneración

9.14. Estrés oxidativo y alteraciones del calcio

9.15. Mecanismos apoptóticos en la degeneración neurofibrilar en la EA

9.16. Hipótesis amiloidea de la EA

9.17. Carta de consentimiento informado

10. BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas contribuyen de manera significativa a la morbimortalidad de la población de edad avanzada, aproximadamente 10% de las personas mayores de 65 años padecen demencia y cerca de la mitad son por la Enfermedad de Alzheimer (EA). Este es un desorden neurodegenerativo central, especialmente de las neuronas colinérgicas del hipocampo, áreas neurocorticales y estructuras límbicas. Desde el punto de vista neuropatológico se caracteriza por la presencia de atrofia cortical, placas neuríticas (PN), marañas neurofibrilares (MNF) y muerte neuronal. Clínicamente presentan pérdida gradual de las funciones cognitivas afectando la memoria reciente, el razonamiento abstracto y la concentración; posteriormente desarrollan rigidez, mutismo e incontinencia. Mueren usualmente como resultado de malnutrición, infección o enfermedad cardíaca.

Es un padecimiento genéticamente heterogéneo que se presenta de forma familiar o esporádica. El tipo esporádico representa 90-95% de los casos y aproximadamente 5-10% son de tipo familiar de inicio temprano con un patrón de herencia autosómico dominante. Actualmente se han identificado 3 genes asociados a las formas familiares de la enfermedad, incluyendo al gen PPA que codifica para la Proteína Precursora del β Amiloide, la PS1 (presenilina1) y PS2 (presenilina 2).

De los casos totales de EA de inicio temprano la mayoría de las mutaciones reportadas se presentan en el gen PSEN-1 (65-70%). Dentro de éste, el 50% de las mutaciones reportadas se encuentran en los exones 5, 8 y 12. El gen PSEN-1 está ubicado en 14q24.3, el DNA consta de 8393 Kb y un RNA de 2764 pb. Contiene 13 exones, de los cuales solo 10 son codificantes (3 al 12) y forman una proteína con 467 aminoácidos llamada presenilina. Este polipéptido ha sido implicado en: 1) apoptosis; 2) actividad γ -secretasa; y 3) desarrollo embrionario al dirigir el destino celular a través de la unión a ligandos específicos.

En este estudio se analizó el gen PSEN-1 en dos familias con EA de inicio temprano, dividiendo la investigación molecular en dos partes, la primera abarcando los sitios donde era más probable detectar la mutación (exones 5, 8 y 12) y una segunda parte que se realizó al ser negativa la primera cubriendo el resto del gen (exones 4, 6, 7, 9, 10 y 11).

Se realizó un abordaje multidisciplinario a través de los Servicios de Neurología y Geriatría para establecer el diagnóstico clínico del caso índice y se colaboró con el

Departamento de Patología para recabar el resultado histopatológico de otros familiares similarmente afectados.

Nosotros realizamos el análisis molecular de la región codificante del gen PSEN1 (exones 3 a 12), sin embargo no determinamos mutaciones en las secuencias analizadas; por lo que se debe considerar varios puntos para completar el estudio molecular en estas familias: 1) analizar las regiones no codificantes de PSEN-1 ya que recientemente se han reportado mutaciones, 2) analizar los genes PSEN-2 y PPA; y 3) la posibilidad de heterogeneidad genética, factores ambientales y epigenéticos implicados en la enfermedad.

1. MARCO TEORICO

ANTECEDENTES HISTORICOS

El 4 de noviembre de 1906, Alois Alzheimer describió por primera vez una forma de demencia en una paciente llamada Auguste D, una mujer de 51 años de Frankfurt quien mostró daño cognitivo progresivo, síntomas focales, alucinaciones, delusiones, e incompetencia psicosocial. La exploración neurológica y el reporte histopatológico de este caso fue realizado por Gaetano Perusini, por lo cual a mediados del siglo XX el padecimiento todavía era conocido como enfermedad de Alzheimer-Perusini, dándole crédito a ambos por el trabajo (1-2).

Las estructuras denominadas placas neuríticas (PN) término usado por Simchowit (colaborador de A. Alzheimer) fueron las únicas lesiones absolutamente características y típicas de la corteza senil. En 1904 y 1907, Alzheimer describió unas estructuras similares, refiriéndose a ellas como placas miliares. Desde el primer reporte (1904), él describió una anomalía a la que llamó “degeneración neurofibrilar” (en la actualidad conocidas como marañas neurofibrilares, MNF), lesiones que en ese entonces se conocían como células alzheimerizadas o tipo Alzheimer. Perusini en 1911, observó una posible relación entre las PN y las MNF sin que comprendiera en esa época la razón de esta asociación. Otra lesión neuropatológica fue descrita por Simchowit en 1911 la que denominó degeneración granulovacuolar, aunque ésta fue observada también en otras enfermedades neurodegenerativas. Fue en 1936 que Jervis y Soltz discutieron la entonces llamada forma juvenil de la enfermedad, analizando casos que iniciaron antes de los 45 años. McMenemey observó la semejanza de las PN y MNF en los casos de comienzo temprano y en los cerebros de pacientes con síndrome de Down; determinando que no solo la edad está involucrada en el proceso de la enfermedad y evidenciando una triple dosis del cromosoma 21 como un factor de riesgo para el desarrollo de la EA (1-2).

Con el advenimiento de nuevas técnicas tanto histo-citoquímicos como moleculares que se desarrollaron en las últimas décadas han permitido reclasificar la enfermedad y conocer las PN y MNF de manera ultraestructural (1-2).

Durante los últimos 15 años los descubrimientos de alteraciones moleculares causantes de las formas heredadas de EA han incrementado rápidamente el conocimiento del desarrollo de la neurodegeneración y disfunción cognitiva de la enfermedad. John Hardy et al. en 1991 clonaron y determinaron la secuencia completa del gen PPA del cromosoma 21 y demostraron que la mutación de este gen es la causa de EA con inicio temprano en

un número reducido de familias (2-3). Estudios posteriores mediante análisis de ligamiento en familias con EA llevados a cabo por el grupo de Tanzi en 1995 determinaron una región en el cromosoma 14 e identificaron un gen candidato, al cual denominaron PSEN-1 (2). Subsecuentemente se observó que el gen PSEN-1 presenta una alta homología (80%) con otro gen localizado en el cromosoma 1 en la región p13.2, al cual denominaron PSEN2 (2).

El primer gen asociado a las formas tardías de la enfermedad se identificó en 1991 mediante la aplicación de análisis de ligamiento y se demostró asociación con el gen APOE, siendo la isoforma APOE4 la más frecuentemente relacionada a la aparición de la enfermedad (4). Actualmente más de diez genes por mes son reportados con alguna evidencia positiva o negativa para la asociación a la enfermedad (3-10).

EPIDEMIOLOGIA

En los últimos años, las enfermedades neurodegenerativas se han convertido en uno de los principales problemas de salud pública. Comprenden diversos tipos de padecimientos, los cuales contribuyen de manera significativa a la morbimortalidad de la población de edad avanzada. La EA es la causa más común de demencia, representado 50% de los casos totales y constituyendo la tercera causa de muerte en las naciones industrializadas después del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares. Actualmente hay 13.5 millones de personas con demencia y se estima que para el año 2050 afectará 37 millones, la mayoría de ese incremento se atribuirá al envejecimiento de la población (11- 20).

La edad es el factor de riesgo más importante para las demencias, incluyendo la EA; la prevalencia e incidencia de la demencia se duplica cada cinco años en personas entre 65 y 95 años, por otro lado la demora del comienzo por cinco años disminuiría la prevalencia de la enfermedad por la mitad; al menos en personas menores de 90 años (21-23). En cuanto al sexo, las mujeres parecen tener un riesgo mayor para la EA, aunque esto probablemente pueda deberse más a una mayor expectativa de vida que a factores de riesgo específicos relacionados con el género (2, 22-26). Algunos estudios han demostrado que el tabaquismo y el alcohol tienen un efecto protector; sin embargo estas observaciones pueden deberse a un sesgo de supervivencia en las poblaciones analizadas, ya que en otros estudios no se ha replicado dicha asociación (21-23). También se ha observado que una historia familiar positiva de EA en un pariente de primer grado incrementa el riesgo de desarrollar demencia de aproximadamente tres veces, aunque los datos son insuficientes para determinar si el riesgo se mantiene para mayores de 80 años (22-23). Dos estudios prospectivos y en varios estudios caso-control han reportado que el uso de antiinflamatorios no esteroideos reduce el riesgo de desarrollar EA (22-23, 27-28). Así mismo se ha determinado que los traumatismos craneoencefálicos (TCE) son un factor de riesgo con un $RR \geq 2$; se ha observado que los TCE producen placas amiloideas difusas que son similares a las presentes en la EA (22-23, 29-30). La carencia de educación también es un factor de riesgo para el desarrollo de la demencia, así como para la EA y la demencia de tipo vascular. Una persona no educada mayor de 75 años tiene un riesgo incrementado de dos veces para desarrollar demencia comparado con quienes al menos han completado ocho grados de educación (22-23, 31). El consumo de antioxidantes en la dieta (vitamina E y C), o a través de

suplementos dietéticos, parece tener un efecto neuroprotector y puede mitigar el declive cognitivo relacionado con la edad (32-33); la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados y la disminución de la ingesta calórica se han asociado con un menor riesgo de EA (22).

TIPOS DE DEMENCIA

La demencia es un síndrome de disfunción cerebral que tiene muchas posibles causas:

De origen degenerativo: Enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal, enfermedad de Pick, demencia asociada a enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva.

De origen metabólico o nutricional: hipo e hipertiroidismo, hipo e hiperparatiroidismo, insuficiencia hepática, insuficiencia renal, enfermedad de Wilson, déficit de vitamina B12, déficit de ácido fólico, déficit de vitamina B1.

De origen vascular: multiinfarto y enfermedad de Binswanger.

De origen infeccioso: asociada al SIDA, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, neurosífilis, enfermedad de Lyme, enfermedad de Whipple, encefalitis herpética.

De origen tóxico: alcohol, fármacos, metales.

De origen neoplásico: tumores cerebrales primarios o metastásicos, encefalitis límbica, meningitis carcinomatosa.

Otras: hematoma subdural crónica, demencia postraumática, hidrocefalia normotensiva.

DEMENCIA TIPO ALZHEIMER

La cuarta edición del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of the American Psychiatric Association* (DSM IV) define a la demencia tipo Alzheimer como el desarrollo de múltiples déficits cognitivos, generalmente progresivos que incluyen deterioro de la memoria y al menos 1 de los siguientes: afasia, apraxia, agnosia, o una alteración de las funciones ejecutorias (habilidad o inhibición inapropiada de las respuestas y comportamientos), de modo que un paciente demente es menos eficaz en sus actividades de rutina o las abandona totalmente (Anexo 1) (34).

HISTORIA NATURAL Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA EA

La EA es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de la memoria y demás funciones cognitivas, que incluyen capacidad para resolver problemas de la vida cotidiana, control de las emociones, etc. Los síntomas iniciales en la etapa leve se desarrollan insidiosamente, usualmente no se puede precisar la fecha del inicio de la

enfermedad y solo después de varios años de decline cognitivo sutil suele buscarse la atención médica. La característica principal en la etapa temprana es la pérdida de la memoria, la amnesia es manifestada por la repetición de preguntas o frases, la mala colocación de palabras y la falla para recordar conversaciones. La alteración en la retención y adquisición de nueva información aprendida resulta en el olvido de eventos recientes o en nuevos conocimientos. Cuando el daño en la memoria llega a incrementarse, llegan a ser evidentes signos patológicos en otras actividades cognitivas. La desorientación leve en tiempo y en espacio son comunes; el paciente puede necesitar direcciones para encontrar localizaciones que son familiares o el recordatorio acerca de fechas importantes. El juicio y la resolución de problemas están alterados, frecuentemente tienen dificultades en completar tareas complejas o nuevas y llegan a ser menos productivos en las actividades diarias, tales como conducir un automóvil, operar aparatos eléctricos, etc; así como se incrementa la susceptibilidad a realizar decisiones financieras inapropiadas. Los disturbios del lenguaje incluyen dificultad para encontrar la palabra adecuada, indecisión al hablar y disminución de habla y escritura. Ocurren comúnmente cambios de la personalidad tales como pasividad, desinterés y ocasionalmente el paciente está más retirado del ambiente social aunque todavía es independiente en sus funciones de cuidado personal (vestirse, bañarse, asearse, ir al baño solo), frecuentemente solo permanece ocupado en actividades sociales y de la vida diaria, tales como la atención de los servicios religiosos, cocinar y convivencia con amigos y familiares. Usualmente tienen funciones neurológicas normales y rara vez tienen alteraciones psiquiátricas por lo que parecen saludables a la inspección casual pudiendo escapar a la detección en esta etapa.

Cuando progresan a una etapa moderada, típicamente dentro de 4 a 7 años después del inicio de la enfermedad, se llega a incrementar la dependencia a otros, la memoria reciente es olvidada rápidamente, aunque la información establecida (memoria pasada) puede ser recordada. Frecuentemente son notadas incoherencias obvias en el paciente (por ejemplo, personas recién muertas pueden ser referidas como si ellos todavía vivieran) y puede estar confundido acerca de las relaciones e identidades con parientes vivos. El juicio y resolución de los problemas están dañados notablemente; el conducir y otras actividades cotidianas están abandonadas en esta etapa, la socialización y la realización de tareas simples como lavar platos con el adecuado aseo o hacer cambios se dificultan sin supervisión. El lenguaje se deteriora más, con oraciones incompletas y pobre comprensión de lo hablado y escrito. Durante esta etapa las alteraciones del comportamiento emergen, la agitación, inquietud y desorientación en la noche-día, los

disturbios del sueño, el comportamiento agresivo verbal y físico, las sospechas no razonables, las delusiones (Ejemplo, la creencia falsa que un artículo mal colocado ha sido robado) y las alucinaciones son vistos por los cuidadores de la persona enferma. Es requerida la supervisión del cuidado personal usualmente permitiendo a los pacientes seleccionar ropas inadecuadas (incluyendo la tendencia de vestir la misma ropa), a negarse al baño y al aseo, así como demostrar pobres modales en la mesa.

En la etapa severa existe una dependencia total en los cuidadores, incluso para las funciones básicas y solo permanecen fragmentos de la memoria. Todavía puede ocurrir el reconocimiento emocional de la esposa e hijos, sin embargo la mayoría de las identificaciones se pierden. El lenguaje verbal esta limitado a frases cortas o repetición de palabras y generalmente son incapaces de comprender el lenguaje hablado más simple. Aunque los comportamientos problemáticos (como dar gritos o llorar) suelen ser evidentes, éstos eventualmente llegan a desaparecer. Pueden desarrollarse complicaciones motoras incluyendo disfunción extrapiramidal, epilepsias tónico-clónicas generalizadas y caídas, así como están presentes las incontinencias urinaria y fecal. Ya en la etapa final, el paciente esta postrado en la cama y no comprende nada; son comunes la disfagia y la pérdida de peso. El debilitamiento crónico severo y la muerte son atribuidas usualmente a una de las complicaciones asociadas tales como: embolia pulmonar, neumonía por aspiración, urosepsis, o inanición (35).

La duración media de la EA a partir del diagnóstico es de 9-10 años, aunque existe una amplia variabilidad; la sobrevida se afecta por una edad muy avanzada y una demencia severa, siendo ésta el factor de mayor riesgo para la mortalidad en los adultos más viejos. Otros factores que pueden influir en la progresión incluyen el desarrollo de disfunción extrapiramidal, la psicosis y las alteraciones del lenguaje. Por otro lado, la edad de comienzo no parece ser un factor mayor predictor de la tasa de progresión de la EA (36-38).

CRITERIOS CLINICOS DIAGNOSTICOS PARA LA EA

Para establecer el diagnóstico de la EA se utilizan varios “test”, entre los más utilizados se encuentran los siguientes:

1. Minimental State Examination (MMSE) (Anexo 2) (39)
2. Clinical Dementia Rating (CDR) (Anexo 3) (40)
3. National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and Alzheimer`s Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) (Anexo 4) (41-42)

NEUROPATHOLOGIA DE LA EA

La distribución de la patología de la EA se asocia con una pérdida neuronal y sináptica así como una disminución de la extensión dendrítica; esto lleva a una desconexión de múltiples áreas de asociación, lo cual se refleja en el deterioro cognitivo global que desarrollan durante la enfermedad los pacientes con EA.

CAMBIOS MACROSCOPICOS EN LA EA

Uno de los cambios macroscópicos más frecuentes es el engrosamiento leve a moderado de las leptomeninges en la línea media; microscópicamente corresponde a la agregación de fibroblastos y colágena. Por otro lado existe una disminución de los giros a nivel cerebral, lo cual refleja una disminución en el peso de la masa encefálica en casi todos los pacientes (1000-1100g). Esta atrofia es más aparente en los lóbulos fronto-temporales aunque la región parietal está frecuentemente involucrada; en la base del cerebro la disminución se observa en la superficie ventral del lóbulo temporal, especialmente el giro parahipocampal. El ensanchamiento de los surcos cerebrales resultante de la atrofia es visto sobre todo en la superficie media de los hemisferios. Los nervios craneales son normales a excepción de los tractos y bulbos olfatorios, los cuales están constantemente atrofiados. Los ventrículos laterales a menudo muestran dilatación. El locus *caeruleus* se observa muy pálido siendo la porción rostral de esta estructura la más afectada, sin embargo esto es difícil de discernir sin el estudio microscópico (43-44).

CAMBIOS MICROSCOPICOS EN LA EA

Los signos histopatológicos característicos en el diagnóstico de la EA son la presencia de las placas seniles o neuríticas (PN) y las marañas neurofibrilares (MNF), así como la pérdida de la sinapsis y de las neuronas (las neuronas pequeñas se afectan más que las grandes) (Figuras 1 y 2). También se pueden detectar otras lesiones, tales como la degeneración granulovacuolar, los cuerpos de Hirano y los cuerpos de Lewy.

Fig.1. Neuronas normales y en EA (PN y MNF)

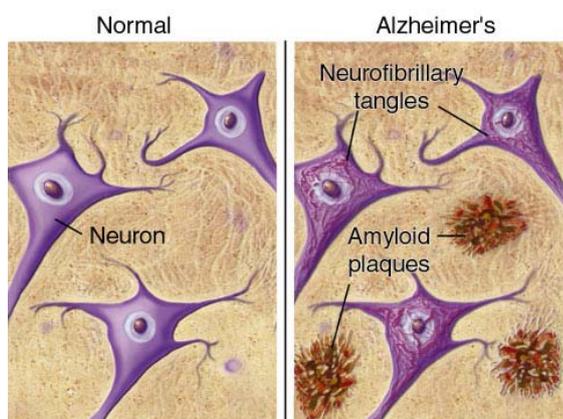
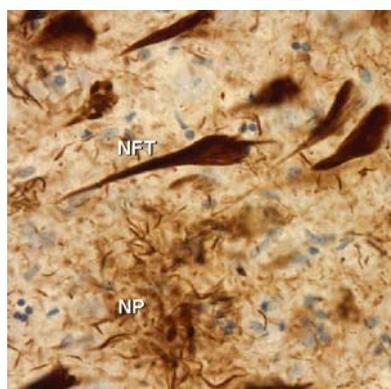


Fig.2. PN y MNF



Las PN son depósitos extracelulares esféricos de 10-100 μm de diámetro que contienen un núcleo formado por proteínas filamentosas anormales rodeado de numerosas neuritas distróficas, microglia activada y astrocitos reactivos; el contenido específico de la PN es el siguiente: PPA (fragmento β 39-42 aminoácidos), receptor de la proteína asociada al crecimiento (GAP43), protein cinasa C, proteína tau, ubiquitina, espectrina cerebral, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), neurofilamentos, sinaptofisina y cromogranina; así como una amplia variedad de neurotransmisores (sustancia P y acetilcolina) (43, 45). El principal componente de la PN es un péptido de 39-42 aminoácidos, con un peso molecular de 4 kD, llamado β amiloide (46-49), que se origina como un producto de la secreción normal de la PPA (PPA β) (50).

Una de las evidencias más claras que definen el papel de la PPA en la EA, es que la presencia de mutaciones en el gen de *PPA* favorece el aumento en la secreción de β amiloide; con el subsecuente desarrollo de la enfermedad (51). La sobreproducción de fragmentos amiloideos es también observada en casos de EA originados por la presencia de mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2*. El efecto patológico de estas mutaciones, reside en el procesamiento de la PPA por proteínas con actividad de β y γ secretasa (52-61).

Se han propuesto muchas hipótesis acerca del origen de la PN (43). Una de las hipótesis más conocidas sostiene que las PN se desarrollan de una placa difusa precedente que puede haber estado presente por muchos años. No obstante se ha observado que esas placas difusas están localizadas no sólo donde las placas maduras fueron encontradas, sino también en la corteza cerebelar y ganglios basales donde las formas maduras casi nunca están presentes. Una segunda hipótesis propone que las PN se desarrollan de los depósitos amiloides en las paredes de los vasos sanguíneos; surgiendo por lo tanto del sistema circulatorio. Una tercera proviene del estudio de biopsias de cerebros humanos y primates en las cuales se ha observado grupos de axones distróficos y ausencia de depósitos amiloides, por lo que algunos autores han sugerido que esos axones dañados son los que liberan amiloide. La cuarta hipótesis señala que el inicio de la formación de la PN se da por degeneración de neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert (NBM) a nivel de las terminales distróficas (43).

Un segundo marcador neuropatológico de la enfermedad son los cambios neurofibrilares del hipocampo y la corteza cerebral, que se encuentran dentro de las neuronas piramidales en forma de marañas neurofibrilares (MNF), en las dendritas como redes de neuropilo y en las neuritas distróficas asociadas con las PN (62-66). Las MNF se pueden observar como parte del envejecimiento normal y hasta un 80% de los ancianos los desarrollarán en las áreas entorrinales antes de los 90 años de edad; no obstante en los pacientes con EA existe una formación generalizada de MNF asociadas con PN, incluso en las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad. Algunos autores han sugerido que los depósitos de PN acelerarían la formación de MNF y datos recientes procedentes de estudios realizados en ratones con doble mutación para PPA apoyan esta hipótesis; así como que la presencia de A β influye en la formación de MNF (66).

Las MNF son depósitos intracelulares de elementos citoesqueléticos formados por filamentos helicoidales apareados. El componente principal de las marañas es la proteína tau (τ) anormalmente fosforilada. Estas proteínas comúnmente asociadas a microtúbulos también pueden estar presentes en el neurópilo y representan un componente más del proceso neurodegenerativo. Las MNF alteran el transporte intraneuronal de los componentes celulares al desplazar los elementos intracitoplasmáticos, lo que interrumpe el transporte exodendrítico y conduce a la muerte neuronal. Es importante destacar que las MNF también se observan en otras enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, parálisis supranuclear progresiva, la degeneración cortico-basal y la demencia frontotemporal), además de que las mutaciones del gen de la proteína τ no están

asociadas con la EA, sino con la parálisis supranuclear progresiva o la demencia frontotemporal (67-68).

Por otro lado la integridad sináptica es esencial para mantener las funciones intelectuales. Todavía se discute sobre el alcance de la pérdida de la sinapsis relacionada con la edad, pero se cree que no afecta de forma significativa a la conectividad cortico-cortical en los sujetos normales. Sin embargo, la pérdida de la sinapsis es muy significativa en las regiones del cerebro afectadas en los pacientes con EA y representa la correlación estructural más importante asociada con la gravedad de la demencia. Se cree que la pérdida de la sinapsis es causada por la muerte neuronal y de los árboles axonales debido a alteraciones citoesqueléticas o neurotoxinas endógenas que destruyen de manera directa el botón sináptico (67, 69-70). También existe una disminución en la concentración de las neuronas grandes en la neocorteza, aunque los mecanismos de muerte neuronal son aún desconocidos. En el hipocampo y región entorrinal, la muerte celular está estrechamente relacionada a la presencia de MNF. La apoptosis sería el mecanismo más probable por el cual las neuronas corticales desaparecerían sin aparente inflamación. La neurodegeneración puede resultar de una mayor toxicidad, pérdida de actividad trófica relacionado al procesamiento anormal de la proteína PPA o a la deficiencia de factores tróficos debido a la disminución del flujo axoplásmico. El efecto tóxico combinado del péptido intracelular (β amiloide) y el glutamato extracelular pueden dirigir a daño sináptico y posteriormente a muerte celular por apoptosis. Algunos trabajos recientes han demostrado que células apoptóticas de pacientes con EA sobre-expresan los genes Bax y Jun (pro-apoptóticos), mientras células con MNF exhiben disminución del gen Bcl-2 (anti-apoptótico); adicionalmente, estudios *in vitro* han mostrado que el péptido β amiloide subregula Bcl-2 y sobreexpresa Bax, sugiriendo que diversos factores tóxicos en EA causan activación de las vías de apoptosis (43, 71).

MÉTODOS DE DIAGNOSTICO NEUROPATOLÓGICO

Para realizar un diagnóstico definitivo de la EA es indispensable comprobar la presencia de PN y MNF en un paciente diagnosticado clínicamente de padecer la enfermedad de Alzheimer. No obstante, es necesaria la determinación de la existencia de PN en una cantidad apreciable, puesto que, para algunos autores en el envejecimiento normal existen PN y MNF dispersas en la corteza, lo que para otros investigadores podrían ser casos preclínicos de EA.

Para identificar las lesiones neuropatológicas características de la EA se utilizan diversas tinciones histoquímicas basadas en plata; tales como la de Bielschowsky, Colmes o Bodian, Tioflavina S y Rojo Congo. La inmunohistoquímica demuestra varios componentes bioquímicos de las PN y MN, mediante técnicas de inmunoperoxidasa utilizando anticuerpos contra las proteínas β amiloide, tau, neurofilamentos fosforilados y ubiquitina.

Existen varios métodos de diagnóstico neuropatológicos, los más utilizados son los siguientes:

a. Métodos semicuantitativos:

- ❖ CERAD (The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) (72-74). Anexo 5.
- ❖ Khachaturian (72). Anexo 6.

b. Métodos topográficos como el de Braak y Braak que permite determinar tanto el estadio como la severidad de la enfermedad (75). Anexo 7.

GENETICA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La etiología de la enfermedad de Alzheimer es compleja y se clasifica en formas de presentación familiar y esporádica (Tabla 1). Los factores ambientales que han sido descritos con gran detalle anteriormente, estarían involucrados en la mayoría de los casos esporádicos y de comienzo tardío, actuando como un tipo de herencia compleja o multifactorial interactuando estos factores con una diversidad de genes que aún no se conocen. Actualmente se ha visto que las características clínicas y los hallazgos neuropatológicos clásicos de la enfermedad surgen de diferentes causas: genéticas y no genéticas (76-77).

Tabla 1. Clasificación de la EA y proporciones de las diferentes formas de presentación.

FAMILIAR	25%
• Comienzo temprano (<65 años)	15-23%
• Comienzo tardío (>65 años)	2-5%
ESPORADICO	75%

A continuación nos enfocaremos a las bases moleculares relacionadas con la enfermedad.

CAUSAS CROMOSOMICAS

La mayoría de las personas con síndrome de Down o trisomía 21 desarrollan características de EA después de los 40 años de edad, en un gran número de estos pacientes se tiene evidencia clínica de deterioro cognitivo. La patogénesis se relaciona con la sobreproducción de A β en los cerebros de estos pacientes quienes son trisómicos para el gen (PPA) localizado en el cromosoma 21 (77).

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO FAMILIAR

La EA de tipo familiar representa un 25% de la totalidad de los casos (Tabla 1) y pueden ser divididos como de inicio temprano (2-5%) y de inicio tardío (15-23%). (77)Tabla 2.

Tabla 2. Enfermedad de Alzheimer de tipo Familiar

EA INICIO TEMPRANO (2-5%)

Nombre	Gen	Locus	Producto	Proporción
*AD1	<i>PPA</i>	21q21.1	PPA	10-15%
*AD3	<i>PSEN1</i>	14q24.3	Presenilina 1	20-70%
*AD4	<i>PSEN2</i>	1q42.1	Presenilina 2	Rara

EA INICIO TARDIO (15 - 23 %)

Nombre	Gen	Locus	Producto	Proporción
AD2	<i>APOE</i>	19q13.2	Apolipoproteína E	Riesgo/ ϵ 4

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE TIPO FAMILIAR DE INICIO TEMPRANO

La mayoría de los pacientes con EA no tienen de antecedentes familiares de la enfermedad; sin embargo, en una minoría de los casos se presenta de manera hereditaria, siguiendo un modo de transmisión autonómica dominante y presentando un inicio precoz de la sintomatología. Las técnicas de biología molecular se han aplicado con éxito para el estudio de las formas familiares de la EA. Hasta el momento, se han identificado tres genes relacionados con las formas familiares de inicio temprano (PPA, PSEN1 y PSEN2), por lo tanto, hay al menos tres subtipos relacionados con mutaciones en estos genes (6, 77). Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Edad de inicio y duración de EA Familiar de inicio temprano (78)

GEN	EDAD DE INICIO	DURACION
<i>APP (AD1)</i>	40-65	9.0-16.0
<i>PSEN1 (AD3)</i>	35-55	5.8-6.8
<i>PSEN2 (AD4)</i>	40-65	4.4-10.8

Tabla 4. Mutaciones en EA familiar de inicio temprano

Gene	# Mutations	# Families
APP	25 (10.87 %)	71 (13.73 %)
PSEN1	155 (67.39 %)	315 (60.93 %)
PSEN2	10 (4.35 %)	18 (3.48 %)

PROTEINA PRECURSORA DE AMILOIDE (PPA)

Uno de los primeros logros en la búsqueda de genes relacionados con el origen de la EA de tipo familiar llegó en 1987 con el descubrimiento de ligamiento genético en el cromosoma 21. Este hallazgo fue importante ya que se sabía que individuos con el síndrome de Down, o trisomía 21, desarrollan en su mayoría lesiones neurológicas similares a las de la EA y que se relacionaba claramente a la presencia de una copia adicional del gen *PPA* localizado en el cromosoma 21. Sin embargo, toda la excitación inicial producida cuando se describió este locus (93), pareció desvanecerse cuando análisis posteriores revelaron que en la mayoría de las familias que se suponía se hallaban ligadas al cromosoma 21, no lo eran. No obstante, en 1991, el grupo dirigido por John Hardy demostró que mutaciones en este gen ocasiona la EA familiar aunque en un número reducido de casos (Tablas 5 y 6) (Anexo 8) (6, 79).

Tabla 5. Mutaciones por exón en PPA

Exon	# Mutations	# Families
Complete gene	5 (20.00 %)	5 (7.04 %)
EX16	2 (8.00 %)	2 (2.82 %)
EX17	18 (72.00 %)	64 (90.14 %)
Total	25	71

Tabla 6. Mutaciones por región en PPA

Domain	# Mutations	# Families
Complete APP	5 (20.00 %)	5 (7.04 %)
N-Term	7 (28.00 %)	15 (21.13 %)
TM-I	13 (52.00 %)	51 (71.83 %)
Total	25	71

Agosto-2006

El gen de la proteína precursora de amiloide (PPA) contiene 19 exones de los cuales el exón 7, 8 y 15 pueden tener *splicing* alternativo. Todas las variantes han sido detectadas por RT-PCR en todos tejidos. Al menos 8 diferentes “core” de proteínas PPA pueden ser sintetizadas como proteínas integrales de membrana tipo I en el retículo endoplásmico. La más amplia y abundantemente expresada de éstas es la forma de 751 aa que contiene el exón 7, el cual codifica una región de 56 aa con propiedades estructurales y funcionales de una serin-proteasa inhibidora de tipo Kunitz (KPI). La isoforma de PPA que esta selectivamente expresada en las neuronas carecen del exón 7 y contiene 695 aa. La PPA 770 contiene el dominio KPI, como también una secuencia de 19 aa con homología al antígeno MRC OX-2 (Fig. 3-4).

Fig. 3. Cromosoma 21, ubicación de PPA: 21q21.1

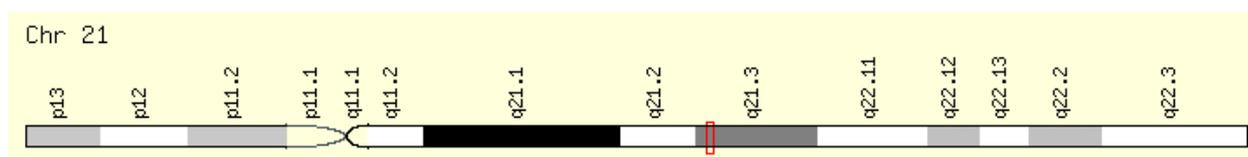
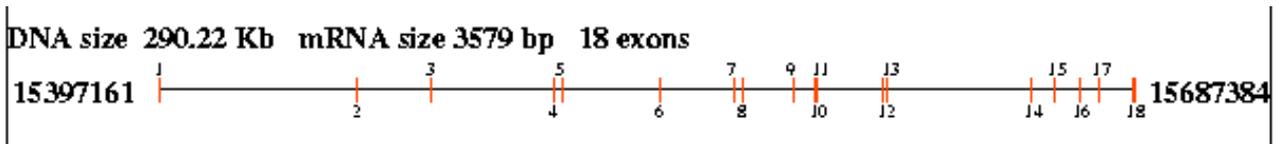


Fig. 4. Tamaño del gen y transcrito de PPA



Se han descrito una variedad de modificaciones postraduccionales de la PPA en cultivos celulares. Después de la síntesis, la PPA es primero glicosilada en el retículo endoplásmico (RE) y después N y O-glicosilada en el aparato de Golgi. Sorprendentemente 70-80% de las formas inmaduramente glicosiladas de PPA son degradadas, probablemente dentro del RE y sólo 20-30% alcanzan Golgi. Durante el tránsito del RE a la superficie celular, PPA también sufre sulfatación y fosforilación. Esta última parece estar restringida al ectodominio y ocurre en un compartimiento post Golgi (50, 80-84). Para ver la estructura, procesamiento y los principales metabolitos, así como las funciones de PPA observar los Anexos 9-10.

PRESENILINAS (PSEN)

El estudio genético molecular de las formas hereditarias de EA de inicio temprano, tuvo como primer resultado la identificación del gen que codifica la PPA como el causante de una minoría de los casos analizados y tal como lo había sugerido St. George-Hyslop et al, este gen no era el causante de la enfermedad en un elevado número de formas familiares (79). Fue en 1992 cuando varios grupos de investigación determinaron que el locus genético responsable de la mayoría de las formas familiares de inicio temprano se encontraba en el cromosoma 14. Tras años de intenso y competitivo trabajo de laboratorio se clonó el gen responsable de estas formas familiares, al que se denominó S182 (PSEN-1). Aunque en esos años el proyecto de genoma humano aún se encontraba en sus primeras fases de desarrollo, fue gracias al trabajo realizado en su marco que se pudo identificar a un gen parálogo de PSEN-1 (PSEN-2). Estudios posteriores realizados en un grupo de familias con EA y un origen étnico-geográfico demostraron mutaciones en este gen. Poco después se propusieron los nombres de presenilina 1 (*PSEN1*) y presenilina 2 (*PSEN2*) por la importancia que estos dos genes tenían en las formas preseniles de la EA. Al igual que en el caso de las alteraciones moleculares identificadas en *PPA*, las mutaciones en las dos presenilinas aumentan la cantidad de péptido A β 42; el cual presenta una mayor tendencia a la agregación, así como un subsecuente aumento en la formación de las PN (6, 51, 85-91).

BIOLOGIA MOLECULAR DE LAS PRESENLINAS

Las estructuras de los genes *PSEN-1* y *PSEN-2* presentan una alta homología (~80%). Cada gen consiste de un total de 13 exones, 10 de los cuales comprenden la secuencia codificante (exones 3-12); la región 5'UTR esta contenida en cuatro exones separados (1a, 1b, 2 y 3). En el gen *PSEN-1* los exones 1a y 1b son exclusivos y representan sitios alternativos para el inicio de la transcripción. El promotor de *PSEN-1* contiene las secuencias consenso (caja TATA y CAAT); en adición, son observados múltiples elementos STAT que están involucrados en la activación transcripcional en respuesta a señales de transducción. En contraste, el promotor *PSEN-2*, carece de la secuencia consenso TATA y CAAT; pero contiene regiones ricas en GC "corriente arriba" de los dos sitios del inicio de la transcripción. Las posiciones equivalentes en los límites intrón/exón de ambos genes también son virtualmente idénticos, consistente con la idea que ambos son derivados de un gen ancestral común que sufrió una duplicación genética (85, 89, 91).

Ambos genes de presenilina tienen *splicing* alternativo; sin embargo el patrón es diferente en *PSEN-1* y *PSEN-2*. En *PSEN-1* el uso alternativo de un sitio donador para el exón 3 resulta en la inclusión/exclusión de los codones 26-29 que codifican para el motivo VRSQ. La inclusión de VRSQ crea un sitio potencial de fosforilación para la proteína cinasa C y la caseína-cinasa II. No obstante, en todos los tejidos examinados los niveles de los dos transcritos no parecen variar de manera importante, sugiriendo que hay poca regulación y especificidad de los tejidos para este evento de *splicing* alternativo. En la *PSEN-2* el motivo VRSQ está parcialmente conservado (WRSQ) y como resultado no sufre *splicing* alternativo. Una segunda variante de *splicing* en *PSEN-1* resulta en la presencia o ausencia del exón 8, aunque éste solo se observa en leucocitos. La importancia de esta variante no esta clara. No obstante, puede ser significativo que el exón 8 contiene altos porcentajes de mutaciones en EA y que el exón equivalente sufre también *splicing* en *PSEN-2*. Una variante más en *PSEN-2* resulta en el *splicing* alternativo de los exones 3 y 4; la ausencia de estos exones resulta en la pérdida del sitio normal del inicio de la traducción.

Los transcritos carentes de estos exones en células transfectadas elaboran proteínas truncadas presumiblemente debido al uso de un codón ATG alternativo “corriente abajo” (89, 91, 92).

Fig. 5. Cromosoma 14, ubicación de *PSEN-1*: 14q24.3

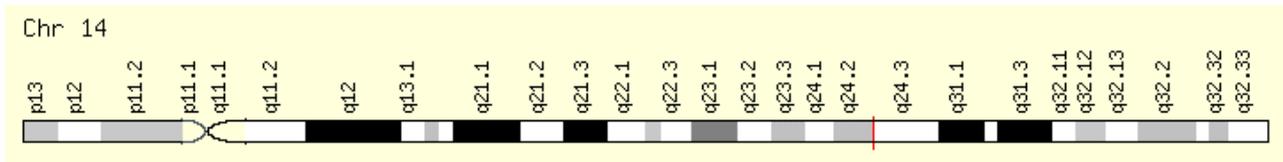


Fig.6. Tamaño del gen y transcrito de *PSEN-1*



Fig.7. Cromosoma 1, ubicación de *PSEN-2*: 1q 42.1

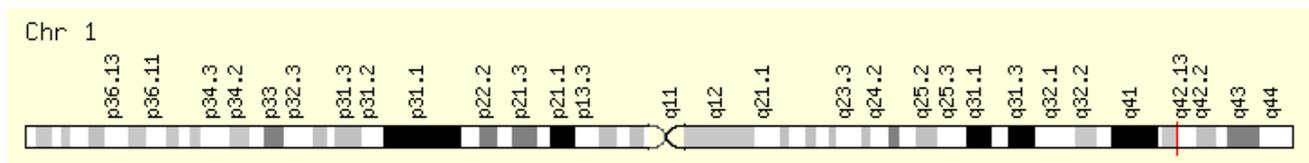


Fig.8. Tamaño del gen y transcrito de *PSEN-2*



Los 2 transcritos mayores de PSEN1 son de al menos 2.7 y 7.5 Kb siendo el más largo el generado por el uso de un sitio alternativo de poliadenilación. Los mRNAs de PSEN2 tienen un tamaño de 2.2 y 2.6 Kb (Figuras 6 y 8). Se propone que la estructura de las proteínas presenilinas contienen ocho dominios transmembranales (TM), los cuales están altamente conservados entre *Psen1* y *Psen2*. Los TM6 y TM7 están unidas por un asa larga acidofílica poco conservada de longitud variable. Las PSEN son proteínas con un alto grado de homología, aproximadamente del 67% a nivel de secuencia y estructura. Las mayores divergencias se dan a nivel de los extremos N y C terminales, así como en un dominio hidrofílico localizado en el último tercio de la proteína, entre el dominio transmembranal VI y el VII (91). (Figura 9).

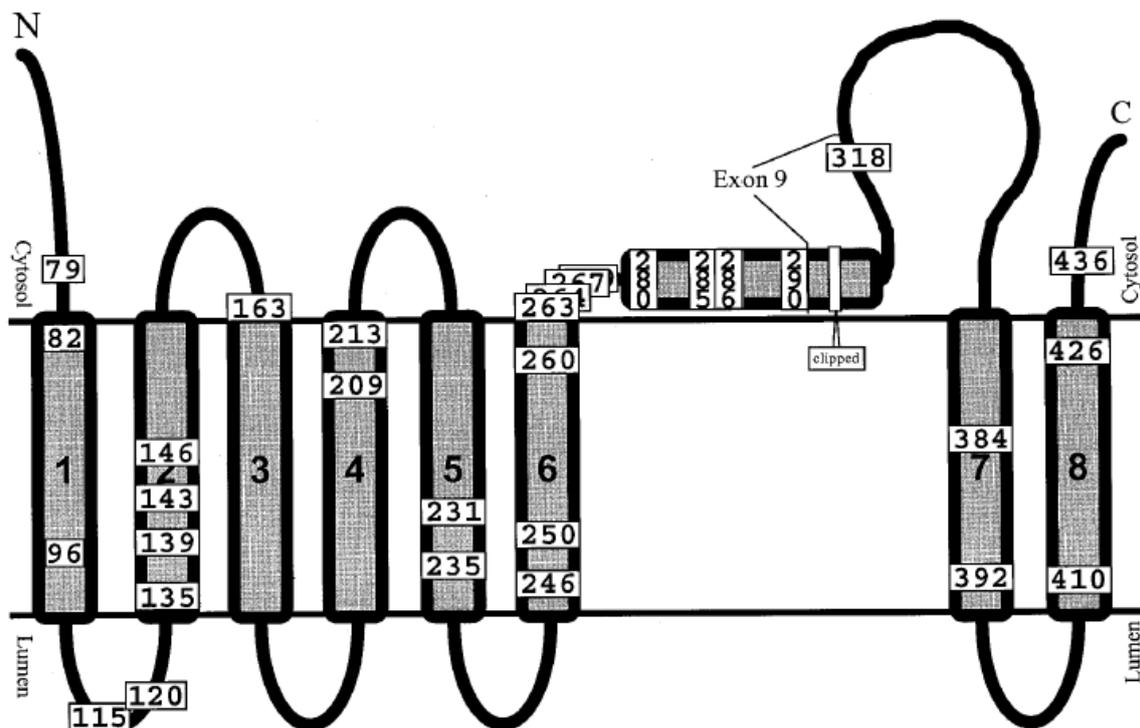


Fig.9. La estructura transmembranal de PSEN1. Se indican algunos sitios de mutación en la proteína. PSEN2 tiene una estructura similar con mutaciones en N141I (N135 en PSEN1) y M239V (M233 en PSEN1). Se piensa que el grupo de mutaciones en el dominio TM2 están sobre el lado de la supuesta α -hélice. Los residuos codificados por el exón 9 están indicados como las que se pierden por la mutación delta 9 que bloquea el proceso de PSEN1. También está marcada la localización del sitio de escisión (*clipped*) endoproteolítico (residuos 291-299).

Ambas PSEN1 y PSEN2 son escindidas proteolíticamente por una(s) proteasa(s) todavía no identificada (s), para generar dos polipéptidos. La PSEN1 sufre un procesamiento, de manera tal que la holoproteína de 45 kDa queda escindida en un fragmento amino terminal de 27-28 kDa y otro carboxilo terminal de 16-17kDa. La longitud total de la proteína PSEN2 (53-55kDa) es también escindida para formar un fragmento amino terminal de 35kDa y uno carboxilo terminal de 20kDa. Para ambas proteínas, las

especies predominantes son los fragmentos procesados que son observados tanto en cultivos de células mamarias como de cerebro. El sitio de mayor escisión proteolítica en PSEN1 ha sido localizado en el residuo 292 codificado por el exón 9, aunque también es observada la escisión en otras posiciones adyacentes (291-299) para generar un grupo heterogénea de fragmentos N- y C-terminales. Las presenilinas también son degradadas por una vía mediada por proteosomas después de su ubiquitinación. No obstante, la relación que existe entre las dos vías de degradación, aún no ha sido determinada (85, 91, 93-94).

El análisis inmunohistoquímico de una variedad de cultivos de células no neuronales que expresan transitoriamente PSEN1 y PSEN2 reveló que las proteínas estaban localizadas en similares compartimentos membranosos intracelulares, incluyendo el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi. En células no transfectadas y células establemente transfectadas (en las cuales los fragmentos de 27 y 17kDa de PSEN1 son los predominantes), la inmunoreactividad de PSEN1 estuvo restringida al retículo endoplásmico. En cultivos de neuronas hipocámpales de ratas, la tinción de PSEN1 estuvo concentrada en los compartimentos somatodendríticos, aunque también estuvo en niveles más bajos en los axones. Estudios recientes han demostrado que la PSEN1 también está localizada en la superficie celular, membrana nuclear, cinetocoros y centrosomas (95-99).

Estudios inmunohistoquímicos de cerebros de roedores, primates y humanos utilizando anticuerpos selectivos para los fragmentos N- y C-terminales de PSEN1 revelaron que la presenilina1 esta presente en todas las regiones cerebrales, con inmunotinción mayor en neuronas y en los neurópilos, incluyendo axones y dendritas; mientras que la inmunoreactividad más débil estuvo en las células gliales. El fraccionamiento subcelular de cortes de cerebros de primates reveló que la PSEN1 está en los compartimentos membranosos vesiculares no sinápticos. Mediante un anticuerpo específico para el fragmento N-terminal de PSEN1 se demostró una inmunoreactividad selectiva sobre las superficies citoplasmáticas de los organelos membranosos en los cuerpos celulares neuronales, sugiriendo una localización predominante en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi y una localización menos prominente en las vesículas de transporte (95).

Aunque la PSEN2 se expresa en diferentes grados en todos los tejidos analizados, los niveles de expresión son particularmente bajos en el cerebro y relativamente altos en el tejido músculo esquelético, corazón y páncreas. A pesar de la similitud de los genes y proteínas de PSEN1 y PSEN2, estudios de Northern blot e hibridación *in situ* indican que

los niveles de expresión de PSEN2 son mucho más bajos que los de PSEN1. Interesantemente, mientras el transcrito más pequeño es detectado en todos los tejidos examinados, el transcrito más grande es únicamente detectado en corazón, músculo esquelético y páncreas (100-101).

Estudios de RT-PCR utilizando RNA derivado de una variedad de tejidos normales (corazón, cerebro, hígado, pulmón, placenta y músculo esquelético) indican la presencia de productos raros de PSEN2 por *splicing* alternativos, los cuales incluyen diferentes tipos, como los producidos por la delección del exón 8, así como la de los exones 3 y 4. Los eventos de corte y empalme de los exones 3/4 y el exón 8 parecen ser eventos independientes los cuales ocurren en un grado menor en todos los tejidos examinados. El exón 8 codifica 32 aminoácidos que comprenden la última parte del dominio TM6 y la primera parte del gran asa hidrofóbico. El *splicing* alternativo de los exones 3 y 4 parece ser un evento inusual dado que esos mRNAs carecen de la metionina iniciadora, y se dice que si esos transcritos son traducidos ellos iniciarían en una metionina internalizada. De forma interesante, la metionina localizada en el codón 145 sería una buena candidata como secuencia consenso para el inicio de la traducción y se ha sugerido que si esos transcritos son funcionales, esta metionina debería ser utilizada (100).

Estudios inmunohistiquímicos y de hibridación *in situ* indican que en el cerebro la PSEN2 se detecta principalmente en neuronas y particularmente en el cuerpo citoplasmático. En estos estudios se detectó una señal más intensa de tinción en grandes neuronas piramidales (115).

Si bien existen reportes de la localización de PSEN2 tanto en la superficie celular como en la membrana nuclear, hay un consenso general que la localización primaria subcelular de la PSEN2 está dentro de membranas intracelulares del retículo endoplásmico y el complejo de Golgi (96, 100).

FUNCIONES DE LAS PRESENLINAS

Delimitar la función o funciones de las presenilinas ha sido una tarea compleja. Se les ha asignado diferentes funciones, incluyendo las de apoptosis, transporte, y actividad γ -secretasa entre otras.

APOPTOSIS

Estudios iniciales han mostrado que la parte C-terminal de PSEN2 podía estar implicada en la regulación de procesos apoptóticos. Más tarde, se ha observado que células transfectadas con PSEN-2 presentaban una susceptibilidad mayor frente a estímulos apoptóticos y que esta susceptibilidad se veía incrementada cuando la proteína sobreexpresada incluía mutaciones causantes de la EA. Por otra parte, el dominio C-terminal de la PSEN1 parece actuar protegiendo a la célula contra la apoptosis cuando se sobreexpresa en células Jurkat (85, 102-103).

Por otro lado, experimentos utilizando el sistema de doble híbrido en levaduras han identificado a Bcl-XL como un elemento que interacciona con el dominio C-terminal de las presenilinas y ya que Bcl-XL es una proteína implicada en la regulación negativa de la apoptosis, este efecto las implicaría como intermediarias en el proceso apoptótico (104-105).

DESTINO CELULAR

El desarrollo de *ratones knock-out* para *Psen1* ha proporcionado información importante acerca de la función de esta proteína. Su ablación en estos modelos provoca letalidad embrionaria debido a anomalías en el desarrollo del sistema esquelético; así como a hemorragias en el SNC. Las medidas en el espesor de la zona ventricular del cerebro de estos embriones de ratones *knock-out* sugieren la existencia de déficit en neurogénesis, así como que la *Psen1* es importante en la formación del esqueleto axial, neurogénesis normal y supervivencia neuronal. Por el contrario, los ratones en los que se elimina el gen de *Psen2* no sufren un fenotipo tan visible, generalmente son viables y fértiles, solo presentan fibrosis pulmonar leve y hemorragias con la edad. De hecho, la ausencia de las dos *Psen* produce un fenotipo similar al ocasionado por la eliminación de la vía Notch de señalización celular en el desarrollo embrionario. Además, en experimentos en los que se estudian neuronas procedentes de ratones a los que se les ha eliminado la copia

endógena de *Psen1*, se ha observado que la síntesis del péptido A β se encuentra fuertemente reducido (85, 100, 106-107).

PSEN Y ACTIVIDAD γ -SECRETASA

Uno de los aspectos en los que mayor esfuerzo se ha invertido a la hora de identificar dianas terapéuticas específicas para la EA es conocer la actividad γ -secretasa en las neuronas, partiendo de la hipótesis de que si se consigue evitar, o regular, la sobreproducción del péptido A β , se podrá evitar en ciertos casos la aparición de la enfermedad o detener su avance. Se ha sugerido que la producción de las dos variantes del péptido A β , (A β ₄₀) y (A β ₄₂), parecerían darse en la misma vía sintética con diferencias en las condiciones del entorno del procesamiento, pH, o por tratarse de dos enzimas distintas. La abolición de la actividad γ -secretasa en modelos celulares que carecen de PSEN1 indica la existencia de una relación directa entre ésta y el procesamiento de la PPA (85, 95).

Una serie de estudios mediante mutagénesis dirigida en los residuos de aspartato en las posiciones Asp 257 y Asp 385 localizada en los dominios transmembrana TM6 y TM7 demostró que eran necesarios para que se diera la actividad γ -secretasa. La sustitución de uno u otro de estos residuos o de ambos a la vez, por el aminoácido alanina, reducía considerablemente la producción del péptido amiloide, a la vez que producía un aumento en la acumulación de los sustratos de la α -secretasa (C-83) o la β -secretasa (C99). También se ha observado que la sustitución de estos residuos evita el procesamiento que sufre la holoproteína para producir los fragmentos amino y carboxilo-terminal. También tras realizar experimentos análogos en PSEN2: la sustitución de los residuos de aspartato en ambas PSEN provoca la desaparición de la vía productora del péptido A β , acompañada de la acumulación de los fragmentos C83 y C99 (85, 95, 108-109).

La implicación de las PSEN en el procesamiento de la PPA podría darse a través de distintos niveles; ya sea en el transporte de la PPA, la actividad γ -secretasa o de ambas, puesto que la producción del péptido A β es sobre todo en la vía endocítica; mientras que las PSEN parecen localizarse, mayoritariamente, en el retículo endoplasmático; igualmente estas proteínas, podrían actuar como cofactores de la γ -secretasa o incluso ser ellas las γ -secretasas. De hecho, tres grupos de investigación presentaron evidencias que implicaban directamente a las PSEN en la actividad γ -secretasa. Sin embargo, existe cierta contradicción en estos resultados, sobre todo debido a la localización subcelular de

cada uno de estos componentes. La PPA se sintetiza en el retículo endoplásmico desde donde migra hacia la membrana plasmática a través del aparato de Golgi en donde la proteína madura. Una vez alcanzada la membrana, la PPA es procesada por las α o las β secretasas y libera un fragmento soluble que corresponde a la mayor parte de la proteína y produce unos fragmentos que contienen el dominio transmembrana junto con el dominio intracelular y los fragmentos C83 (procesamiento α) y C99 (procesamiento β), que son posteriormente procesados. Del procesamiento de C99 se produce el péptido A β (85, 108-112).

OTRAS POSIBLES FUNCIONES

Las PSEN parecen desempeñar otras funciones además de la de aspartil-proteasas. La utilización de la tecnología del doble híbrido en levaduras ha permitido identificar varias interacciones entre los diferentes dominios de las PSEN con otras proteínas, dándose el caso de que el mismo dominio de la PSEN1 presenta interacciones con distintas proteínas (85).

Se ha identificado una nueva proteína (cuyo gen está localizado en el cromosoma 16) que interacciona con el dominio N-terminal de PSEN1. Este péptido parece formar parte de un complejo multiproteico relacionado con las proteínas de choque térmico hsp 70 y hsp 90, aunque no está claro aún su relación con la PSEN1 (85).

Otro grupo de investigadores describió la existencia de interacciones del dominio TM6 y TM7 (tanto de PSEN1 como de PSEN2) con proteínas relacionadas con el citoesqueleto, tanto con la filamina no muscular, la cual es una proteína de unión a la actina 280, ABP280 y cuyo gen se localiza en el cromosoma X, como con la Fh1, la cual es homóloga a la filamina y cuyo gen se localiza en el cromosoma 3. Estas proteínas se han localizado en las lesiones intracelulares observadas en la EA, como las MNF o las neuritas distróficas, por lo que podrían ser un eslabón entre las PSEN y la disfunción del citoesqueleto que se da en la EA (85).

Utilizando una región entre los dominios TM6 y TM7 algunos investigadores describieron la interacción de ésta con la proteína Rab11, una GTPasa perteneciente a la familia Ras. La interacción se establece entre los aminoácidos 374-400 de la PSEN1 y puesto que se ha implicado a la familia de proteínas Rab en el transporte vesicular, es posible que esta interacción sea reflejo del papel de PSEN1 en el transporte vesicular (85).

Varios estudios han identificado a la calsenilina (perteneciente a la familia de sensores de calcio) como una nueva proteína relacionada con el PSEN-1. Demostraron que la

PSEN podía tener un efecto tóxico para las células al provocar la liberación del calcio del retículo endoplásmico tras la estimulación de la vía del inositol trifosfato. La calsenilina parece compensar el aumento en la concentración de calcio intracelular que se produce en células transfectadas con las PSEN mutadas sin unir el calcio directamente y a través del dominio C-terminal. Además, PSEN2 también interacciona con otra molécula implicada en la regulación de los niveles de calcio, sorcina, mediante la modulación de los canales liberadores de calcio intracelulares del receptor de la rianodina. Estos datos indican que una parte del daño neuronal provocado por la presencia de mutaciones en las PSEN pueden deberse a la desregulación en la homeostasis del calcio intracelular que llevarán a la célula a apoptosis o muerte celular programada (113-114).

Las PSEN también parecen interaccionar con β -catenina y otras moléculas relacionadas. La β -catenina es una proteína citoplasmática que se halla implicada en procesos de regulación, proliferación e interacciones célula-célula. En la membrana plasmática funciona estabilizando uniones intercelulares dependientes de calcio, interaccionando con el dominio intracelular de las caderinas (85).

MUTACIONES EN LAS PRESENILINAS

De acuerdo a la “*Alzheimer’s disease Mutation Database*” actualmente se reportan las siguientes proporciones para mutaciones en los genes PSEN-1 (Tablas 7-8) y PSEN-2 (Tablas 9-10) (Anexos 11 y 12).

Tabla 7. Mutaciones por exón en la PSEN1

Exon	# Mutations	# Families
EX4	12 (7.74 %)	19 (6.15 %)
IVS4	1 (0.65 %)	9 (2.91 %)
EX5	33 (21.29 %)	78 (25.24 %)
EX6	19 (12.26 %)	35 (11.33 %)
EX7	32 (20.65 %)	61 (19.74 %)
EX8	24 (15.48 %)	56 (18.12 %)
IVS8-IVS9	2 (1.29 %)	3 (0.97 %)
IVS8	2 (1.29 %)	5 (1.62 %)
EX10	4 (2.58 %)	4 (1.29 %)
EX11	14 (9.03 %)	22 (7.12 %)
EX12	12 (7.74 %)	23 (7.44 %)
Total	155	315

Tabla 8. Mutaciones por dominio en PSEN1

Domain	# Mutations	# Families
N-Term	1 (0.65 %)	7 (2.27 %)
TM-I	2 (1.29 %)	2 (0.65 %)
HL-I	1 (0.65 %)	1 (0.32 %)
TM-I	4 (2.58 %)	5 (1.62 %)
HL-I	17 (10.97 %)	34 (11.00 %)
TM-II	20 (12.90 %)	55 (17.80 %)
HL-II	3 (1.94 %)	15 (4.85 %)
TM-III	16 (10.32 %)	21 (6.80 %)
HL-III	2 (1.29 %)	3 (0.97 %)
TM-IV	10 (6.45 %)	28 (9.06 %)
HL-IV	4 (2.58 %)	5 (1.62 %)
TM-V	13 (8.39 %)	20 (6.47 %)
TM-VI	7 (4.52 %)	15 (4.85 %)
HL-VI a	14 (9.03 %)	24 (7.77 %)
HL-VI (MA)	11 (7.10 %)	31 (10.03 %)
HL-VI b	4 (2.58 %)	4 (1.29 %)
TM-VII	11 (7.10 %)	17 (5.50 %)
HL-VII	1 (0.65 %)	1 (0.32 %)
TM-VIII	3 (1.94 %)	5 (1.62 %)
HL-VIII	2 (1.29 %)	2 (0.65 %)
TM-VIII	1 (0.65 %)	1 (0.32 %)
C-Term	8 (5.16 %)	19 (6.15 %)
Total	155	315

Agosto - 2006

Tabla 9. Mutación por exón en PSEN2

Exon	# Mutations	# Families
EX4	1 (10.00 %)	1 (6.25 %)
EX5	4 (40.00 %)	10 (62.50 %)
EX7	3 (30.00 %)	3 (18.75 %)
EX12	2 (20.00 %)	2 (12.50 %)
Total	10	16

Agosto - 2006

Tabla 10. Mutaciones por dominio en PSEN2

Domain	# Mutations	# Families
N-Term	1 (10.00 %)	1 (6.25 %)
HL-I	2 (20.00 %)	2 (12.50 %)
TM-II	2 (20.00 %)	8 (50.00 %)
TM-V	3 (30.00 %)	3 (18.75 %)
C-Term	2 (20.00 %)	2 (12.50 %)
Total	10	16

Agosto - 2006

EFECTO DE LAS MUTACIONES EN PRESENILINAS SOBRE A β 42

Las mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2* están asociadas con la producción incrementada de A β 42, la forma amiloidogénica de A β que es depositada selectiva y tempranamente en la EA. Esta observación fue hecha inicialmente en el plasma y en cultivos de fibroblastos de pacientes procedentes de familias con EA con patrón de herencia autosómico dominante comparado con sujetos controles. Un incremento similar no se detectó en los niveles de A β 40. Por otro lado, mediciones de A β 42 y A β 40 fueron realizadas en familias con tres mutaciones diferentes de *PSEN1* y una familia alemana del Volga con mutación en *PSEN2*, usando un ensayo de ELISA que detecta específicamente las diferentes formas de A β . El incremento en A β 42 fue similar a los descritos en el estudio en el plasma de familias con mutaciones en PPA717, así como los niveles de Ab 40 no tuvieron efectos significativos. Por lo que se puede concluir las mutaciones de PPA y presenilinas incrementan de manera importante la producción del A β 42, lo que sugiere una vía patogénica común (91).

Estudios subsecuentes han demostrado una producción incrementada de A β 42 en líneas celulares transfectadas; así como en cerebros de ratones transgénicos que expresan formas mutantes de *PSEN1* y *PSEN2*, estos resultados son consistente con las observaciones originalmente realizadas en el plasma y fibroblastos de los pacientes con EA. Sin embargo, no esta clara la conexión entre los niveles observados de A β 42 con cada una de las mutaciones y con la severidad del fenotipo asociado. Muchos factores serían responsables de estas variaciones en las investigaciones clínicas y uno de ellos

sería el efecto de diferentes antecedentes genéticos sobre la edad de inicio de la enfermedad (91, 115-116).

El mecanismo por el cual las mutaciones en presenilinas alteran la producción de A β 42 todavía no ha sido determinado; una posibilidad es que la interacción directa entre las presenilinas y PPA causa una escisión sutil en la PPA por una o múltiples enzimas γ -secretasa. Dos observaciones son consistentes con esta hipótesis: primero, las presenilinas y la PPA están colocalizadas en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, y segundo, la reciente demostración que Psen2 y PPA forman complejos estables en células transfectadas. En este último estudio estudio, se utilizó células mamarias cotransfectadas con PPA y PSEN2. La inmunoprecipitación de Psen-2 reveló que una proporción de PPA estuvo asociada con inmunocomplejos Psen-2; similarmente, la precipitación de PPA reveló moléculas asociadas de psen-2. La interacción fue no covalente y estuvo restringida a formas inmaduras de PPA, sugiriendo que la interacción ocurrió durante el tránsito de PPA a través del retículo endoplasmático. Por lo tanto, las conclusiones de este estudio son que las mutaciones de presenilinas pueden influir directamente el corte por γ -secretasa de la PPA, o que pueden causar una alteración en el tráfico de PPA, originando que entre una mayor proporción a la vía que dirige a la generación de A β 42 (91).

MECANISMOS DE NEURODEGENERACION EN LA EA

Dentro de la patogénesis y mecanismos de neurodegeneración de la EA consideramos los siguientes incisos a seguir:

1. Procesamiento de la PPA y neurodegeneración (Anexo 13)
2. Estrés oxidativo en la EA (Anexo 14)
3. Alteraciones del calcio en la EA (Anexo 14)
4. Mecanismos apoptóticos en la degeneración neurofibrilar en la EA (Anexo 15)
5. Hipótesis Amiloidea de la EA (Anexo 16)

DIAGNOSTICOS DIFERENCIALES

Los principales diagnósticos diferenciales de la EA son: la enfermedad de Parkinson, la demencia por los Cuerpos de Lewy, la demencia fronto-temporal, la esclerosis lateral amiotrófica, la Enfermedad de Huntington y la enfermedades por priones (Fig.10) (Tabla 11).

ENFERMEDAD DE PARKINSON (PD)

Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en la vida adulta. Histopatológicamente se caracteriza por una pérdida severa de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra e inclusiones citoplasmáticas consistentes en agregados proteínicos insolubles (cuerpos de Lewy), lo que se traduce en un desorden progresivo del movimiento que incluye la triada clásica (tremor, bradicinesia, y rigidez) con una edad de comienzo entre los 50 y 60 años. Una proporción pequeña de todos los casos son debidos a factores genéticos, y como en la EA, parece ser dependiente de la edad de comienzo: la mayoría de los individuos con un comienzo temprano o juvenil muestran un patrón de herencia mendeliano (137).

Se han asociado mutaciones en al menos 5 genes en casos familiares de inicio temprano de parkinsonismo (α -sinucleína [SNCA o PARK1]; parkina [PRKN o PARK2]; DJ-1 [DJ1 o PARK7]; PTEN-*induced putative kinase 2* [PINK1 o PARK6]; y leucine-rich repeat kinase 2 o dardarina [LRRK2 o PARK8]. El primer locus en ser caracterizado fue PARK1 en 4q21 que involucra una proteína que representa el mayor componente del *core* de los cuerpos de Lewy. El mecanismo exacto de la α -sinucleína permanece desconocido; no obstante, evidencias recientes sugieren que algunas mutaciones pueden cambiar la función normal de la proteína (más cuantitativa que cualitativamente) vía duplicación o triplicación de este gen. Muy recientemente, se han identificado mutaciones en un segundo gen (LRRK2) con forma autosómica dominante y se sugiere que algunos de estos cambios interfieren con la actividad protein-cinasa. Sin embargo, hasta un 50% muestra una herencia autosómica recesiva involucrando a otro gen, la parkina (PRKN) en 6q25; ésta es una ubiquitin-ligasa que esta involucrada en la ubiquitinización de proteínas blancas para la degradación vía el sistema proteosómico. Al menos otros 6 loci candidatos han sido descritos sin mostrar una consistencia entre los diversos estudios realizados (137).

DEMENCIA POR CUERPOS DE LEWY (LBD)

De acuerdo con algunos investigadores, la LBD es el segundo tipo más común de demencia en la vejez, presentándose en más de un 15% de todos los casos de demencia confirmados por autopsias. Clínicamente se caracteriza por daño cognitivo progresivo con un curso fluctuante, alucinaciones visuales recurrentes, y parkinsonismo. Hay un gran solapamiento clínico entre los pacientes con LBD y los de EA y PD con demencia. La característica histológica predominante es la presencia de cuerpos de Lewy corticales y subcorticales. Aunque un análisis de ligamiento familiar ha identificado un gen candidato en 12p12, se considera que hay una gran heterogeneidad genética. Algunos estudios han asociado a la α -sinucleína y a APOE-e4 como factores de riesgo genético, aunque de manera inconsistente (137).

DEMENCIA FRONTOTEMPORAL (FTD)

Es un grupo heterogéneo de síndromes definidos clínicamente por un cambio gradual y progresivo en el comportamiento y la conducta, así como por una disfunción progresiva del lenguaje. Los síntomas iniciales ocurren típicamente sin afectar otros dominios cognitivos y rara vez se presenta más allá de los 75 años. En algunos casos, el déficit de comportamiento y lenguaje se acompaña de parkinsonismo o enfermedad de la neurona motora progresiva. Neuropatológicamente, la FTD se caracteriza por neurodegeneración en los lóbulos frontal y/o temporal. Las neuronas afectadas exhiben inclusiones intracelulares tau positivas que son distintas de las observadas en las MN de la EA. Un 25-40% de todos los casos son familiares y se cree que existen diferentes factores genéticos involucrados en la patogénesis. La primera mutación identificada fue en 17q21 (FTDP-17), cuyo gen se llama MAPT y que codifica para la proteína tau. Reportes recientes han sugerido que algunos casos de FTD pueden ser causados por mutaciones en PSEN1 (137).

ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ALS)

Esta enfermedad se caracteriza por una degeneración rápidamente progresiva de las neuronas motoras, tanto en el cerebro como en la médula espinal, lo cual dirige a parálisis y muerte prematura. La prevalencia de ALS es baja (5 en 100000 individuos), aunque la incidencia se incrementa con la edad, mostrando un pico entre los 55 y 75 años. Las características neuropatológicas incluyen acumulaciones intracelulares como inclusiones de neurofilamento (NF) e intracelulares tales como los cuerpos de Burina y cuerpos similares a los de Lewy. Aproximadamente en un 5% de pacientes con la ALS pueden

coexistir daño cognitivo y demencia. Un 10% de todos los casos son familiares. Además de las variantes en MAPT, han sido mostradas mutaciones en otros 2 genes (SOD1 y ALS2) como causantes de esta enfermedad.

Las mutaciones de las formas autosómicas dominantes causantes de ALS se identificaron inicialmente en el gen que codifica la superóxido dismutasa 1 (SOD1), la cual cataliza la conversión de radicales superóxido en peróxido de hidrógeno. En conjunto estas mutaciones explican un 20% del total de casos familiares y aproximadamente un 10% de los esporádicos. Las mutaciones en SOD1 podrían dirigir a neurodegeneración a través de una alteración del plegamiento proteico, estrés oxidativo, disfunciones citoesqueléticas y excito-toxicidad por glutamato. Recientemente se identificaron en otras familias con esclerosis lateral primaria y con una herencia autosómica recesiva de inicio juvenil un segundo gen (ALS2) que codifica para la alsina, la cual es una proteína neuroprotectora en la presencia de mutaciones SOD1 (137).

ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (HD)

Es una enfermedad causada por degeneración de neuronas en el ganglio basal, la cual se expresa clínicamente como movimientos involuntarios (corea), síntomas psiquiátricos y demencia. Su prevalencia es similar a la ALS. Aproximadamente el 90% de los casos presentan un patrón de herencia autosómica dominante y el gen causante es el HD localizado en 4p16 y que codifica para la huntingtina. Es una enfermedad por tripletes de repetición en donde el tamaño del repetido (CAG) en los enfermos varía desde 35 a 120, exhibiendo una relación inversa con la edad de inicio de los síntomas. Se sugiere que la proteína tiene un papel esencial en el desarrollo neural y homeostasis. Análisis genéticos recientes se han centrado en la búsqueda de otros factores que afectan el comienzo de la HD. El más prometedor de esos es el localizado en 6q25, relacionado al *glutamate receptor, ionotropic, kainate 2* (GRIK2), el cual ha sido asociado con una edad comienzo más temprano (137).

ENFERMEDAD DE CREUTZFELD-JACOB Y OTRAS ENFERMEDADES POR PRIONES

Estas enfermedades incluyen un espectro heterogéneo y poco frecuente de fenotipos histopatológicos y clínicos, los cuales son únicos en el grupo de enfermedades neurodegenerativas, pudiendo ser familiares, esporádicos o adquiridos. Dentro de los casos familiares se encuentran: la enfermedad de Creutzfeld-Jacob (fCJD), el insomnio familiar fatal (FFI) y el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS); los

esporádicos: la enfermedad de Creutzfeld-Jacob (CJD) y el insomnio fatal esporádico (sFI); y por último los adquiridos (Kuru, CJD iatrogénico y la variante de CJD). La mayoría se caracteriza por una neurodegeneración rápidamente progresiva con espongiosis y placas amiloideas, consistentes en agregados de la proteína priónica (PrP), originada por una vía de auto propagación de una PrP no desdoblada o aberrante. Solo una minoría de casos exhibe agregación familiar.

Se han identificado más de 20 mutaciones en la región codificante de la PrP como causantes de enfermedades familiares por priones con un patrón de herencia autosómico dominante y con una penetrancia cercana al 100% (137).

Fig.10. Localización anatómica de los cambios tanto macroscópicos como microscópicos característicos de las enfermedades neurodegenerativas

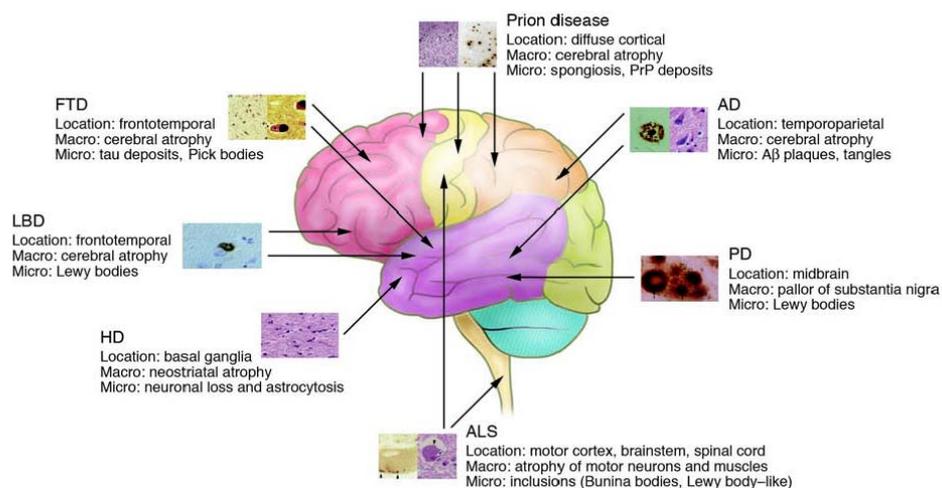


Tabla 11. Genes establecidos para las enfermedades neurodegenerativas

Disease	Gene (first ref.)	Protein	Location	Inheritance	Relevance to pathogenesis
AD	<i>APP</i> (15)	A β precursor protein	21q21	Dominant	Altered A β production (A β ₄₂ /A β ₄₀ ratio \uparrow) and aggregation
AD	<i>APOE</i> (21, 22)	Apolipoprotein E	19q13	Risk factor	Unknown (A β aggregation? lipid metabolism?)
AD	<i>PSEN1</i> (16)	Presenilin 1	14q24	Dominant	Altered A β production (A β ₄₂ /A β ₄₀ ratio \uparrow)
AD	<i>PSEN2</i> (17, 18)	Presenilin 2	1q31	Dominant	Altered A β production (A β ₄₂ /A β ₄₀ ratio \uparrow)
PD	<i>SNCA</i> (32)	α -Synuclein	4q21	Dominant	Neurotoxicity by aggregation of α -synuclein (?)
PD	<i>PRKN</i> (33)	Parkin	6q25	Recessive	Impaired protein degradation via proteasome
PD	<i>DJ1</i> (34)	DJ-1	1p36	Recessive	Impaired oxidative stress response (?)
PD	<i>PINK1</i> (35)	PTEN induced putative kinase 1	1p36	Recessive	Mitochondrial dysfunction (?)
PD	<i>LRKK2</i> (36, 37)	Leucine-rich repeat kinase 2; dardarin	12q12	Dominant	Unknown
FTD	<i>MAPT</i> (53)	Microtubule-associated protein tau	17q21	Dominant	Altered tau-production (4R/3R ratio \uparrow), and/or altered binding to microtubules
ALS	<i>SOD1</i> (63)	Superoxide dismutase 1	21q22	Dominant and recessive	Protein misfolding/aggregation and/or impaired oxidative stress response (?)
ALS	<i>ALS2</i> (68, 69)	Alsln	2q33	Recessive	Impaired neuroprotection (?)
HD	<i>HD</i> (76)	Huntingtin	4p16	Dominant	Unknown
Prion	<i>PRNP</i> (84)	Prion protein	20p13	Dominant and risk	Transformation of PrP ^c into PrP ^{sc}

AD: EA; PD: enfermedad de Parkinson; FTD: demencia fronto-temporal; ALS: esclerosis lateral amiotrófica; HD: enfermedad de Huntington; Prion: enfermedades por priones

ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO BASADOS EN LA BIOLOGIA DEL PEPTIDO A β

Si la EA representa los efectos de un desbalance crónico entre la producción y eliminación de A β y si este desbalance es causado por diferentes factores, ¿cómo debemos tratar y/o prevenir este desorden? Seis estrategias terapéuticas han sido propuestas.

Primero, se puede intentar inhibir parcialmente cualquiera de las dos proteasas (β y γ secretasa) que generan A β a partir de la PPA. En el caso de la β secretasa se está tratando de identificar una molécula pequeña potente inhibitoria que se pueda incluir al sitio activo aspartil-proteasa y que pueda pasar la barrera hemato-encefálica. En el caso de la γ secretasa, ya están disponibles potentes inhibidores permeables a la membrana, sin embargo se han realizado pocas pruebas en humanos ya que la mayoría de estos compuestos pueden interferir con el señalamiento de proteínas Notch y otros receptores de la superficie celular (136, 138).

Segundo, se puede intentar prevenir la oligomerización de A β o potenciar su “clarificación” a nivel de la corteza cerebral. Esta estrategia es ejemplificada por el uso de inmunización A β activa o pasiva, mediante anticuerpos que disminuyen los niveles cerebrales de A β por promoción de la “limpieza” y/o por redistribución del péptido desde el cerebro a la circulación sistémica. La inmunización activa con el péptido A β 42 produce grandes beneficios en ratones PPA transgénicos, sin embargo los ensayos clínicos iniciados en pacientes con EA resultaron en una pequeña fracción inaceptable de sujetos que desarrollaron encefalitis, evitando más estudios de estos preparados (136, 138-142).

Una tercera aproximación sería la estrategia “anti-inflamatoria” basada en la observación de que la respuesta inflamatoria en la corteza cerebral es inducida por la acumulación progresiva de A β . Recientemente se ha demostrado que algunas drogas antiinflamatorias pueden tener efectos directos sobre la vía de escisión de PPA por γ secretasa, independiente de la inhibición ciclooxygenasa y de otros mediadores inflamatorios. En la actualidad se están desarrollando varios ensayos clínicos para la aplicación en pacientes con EA. (136, 143).

La cuarta aproximación está basada en la modulación de la homeostasis del colesterol. Recientemente se han asociado el uso crónico de drogas que disminuyen el colesterol

(estatinas) con una menor incidencia de EA. Por otro lado, dietas altas en colesterol en animales han mostrado incrementar la patología A β , así como que las drogas reductoras de este metabolito reducen la patología en ratones transgénicos PPA (136, 144-146).

La quinta estrategia esta basada en observación que la agregación A β es en parte dependiente de los iones-metales Cu y Zn. Esta estrategia razona que estos iones “*in vivo*” podrían prevenir el depósito A β . En ratones transgénicos tratados con el antibiótico clioquinol, un conocido *chelator* de cobre y cinc el depósito A β fue bloqueado (136, 138).

La sexta estrategia es prevenir los efectos de sinaptotoxicidad y neurodegeneración originada por la acumulación A β . Han sido contempladas numerosas aproximaciones, incluyendo el uso de compuestos con antioxidantes, neuroprotectores y/o neurotróficos, aunque no se han mostrado claros beneficios para el humano (136, 138). (Fig. 11).

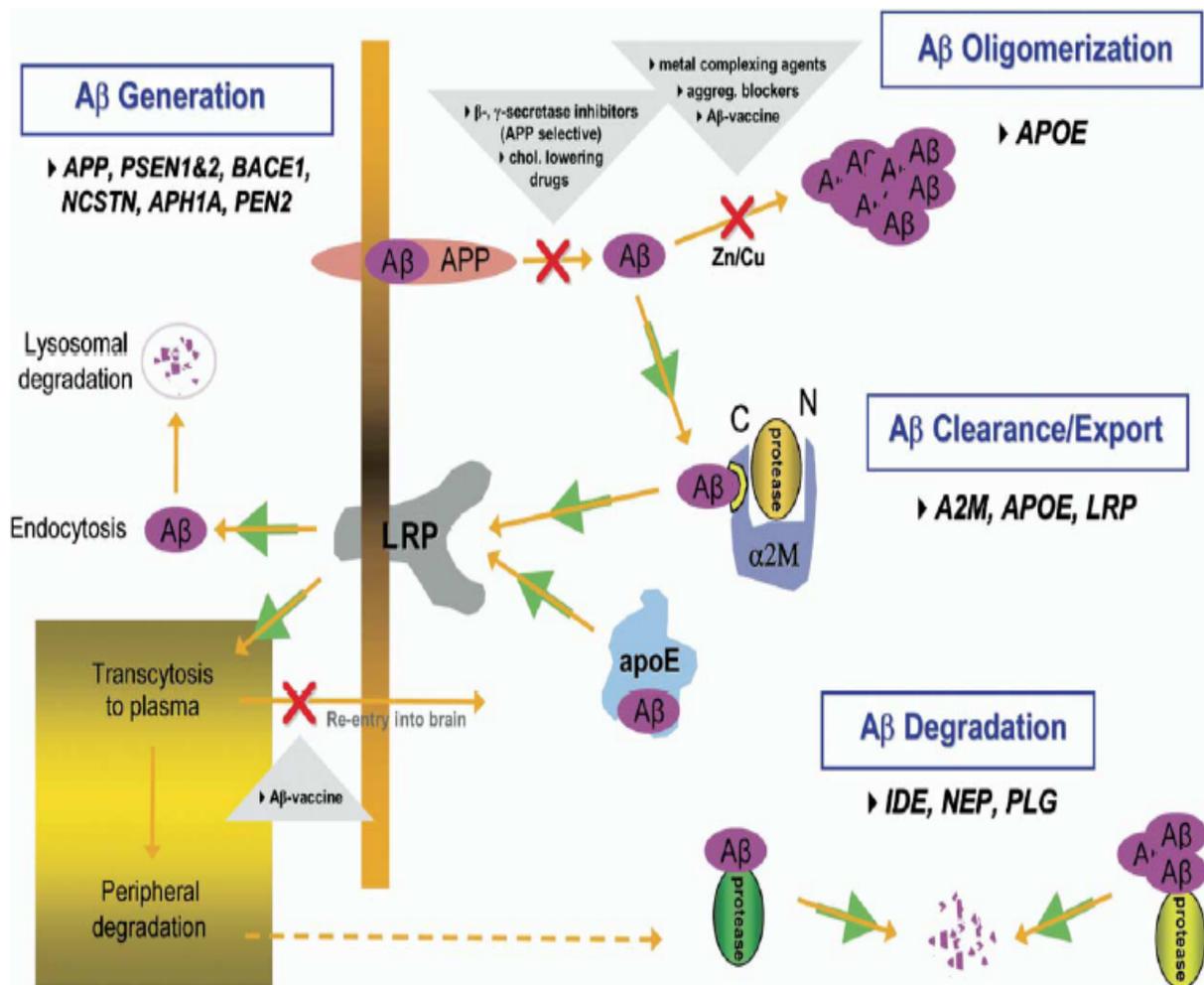


Figura 11. Genes que influyen el ciclo de vida del péptido Aβ y sus posibles puntos de intervenciones terapéuticas. La generación de Aβ en el cerebro esta influenciado por los genes conocidos de las formas familiares de EA de inicio temprano: PPA, PSEN1, y PSEN2 así como los que codifican BACE (β secretasa) y las tres proteínas del complejo γ secretasa (NCSTN, APH1A, y PEN2). Las intervenciones terapéuticas en esta vía incluyen los inhibidores β y γ secretasa y las drogas reductoras de colesterol, por ejemplo las estatinas. Una vez que el Aβ es secretado, los metales (Zn y Cu) y la APOE pueden modular la oligomerización en fibrillas (este nivel también puede ser usado como terapéutica para prevenir la oligomerización). El Aβ también puede unirse a apoE o α2M, las cuales a su vez, pueden liberar el péptido a su receptor común (LRP). Una vez unido, el complejo puede sufrir endocitosis y subsecuente degradación en los lisosomas. Alternativamente, la internalización por LRP en la barrera hematoencefálica puede dirigir a la transcitosis de Aβ dentro del plasma donde el péptido puede ser liberado a los sitios de degradación periférica, por ejemplo el hígado y riñón o reentrar dentro del cerebro. Alternativamente, anticuerpos anti-Aβ generados vía la vacuna de amiloide pueden también entrar en el cerebro y activar la digestión de Aβ. Finalmente, el Aβ puede sufrir degradación por proteasas tal como la IDE (la cual solo escinde péptidos monoméricos), neprilisina, y plasmita en los sitios de degradación periférica o en el cerebro.

2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con los antecedentes planteados, consideramos fundamental que en México se cuente con la herramienta clínica y molecular para entender una de las enfermedades más importantes de la neurodegeneración cerebral, como es la enfermedad de Alzheimer.

Actualmente son pocos los estudios moleculares realizados al respecto en nuestra población y dado que el análisis molecular en distintos padecimientos en población mexicana han dado resultados interesantes y diferentes a los referidos en la literatura internacional, consideramos importante conocer si el comportamiento de la enfermedad es similar a lo ya reportado o si podemos identificar nuevas mutaciones que enriquezcan el conocimiento de esta patología.

Los resultados de estos estudios permitirán generar nuevas líneas de investigación que reproduzcan en sistemas *in vitro* la expresión de las mutaciones encontradas en las familias mexicanas, con el fin de entender mejor el proceso degenerativo de la demencia tipo Alzheimer.

Por otro lado, es fundamental la aplicación de técnicas de biología molecular para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, para poder proporcionar un asesoramiento genético adecuado. Así mismo, con la participación multidisciplinaria de los servicios de Neurología, Patología y Genética se podrá mejorar la calidad de atención a los pacientes con demencia que acuden a este hospital.

3. OBJETIVO

Identificar las alteraciones moleculares de gen *PSEN-1* en dos familias mexicanas con la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano.

4. DISEÑO DE ESTUDIO

Reporte de casos

Criterios de inclusión

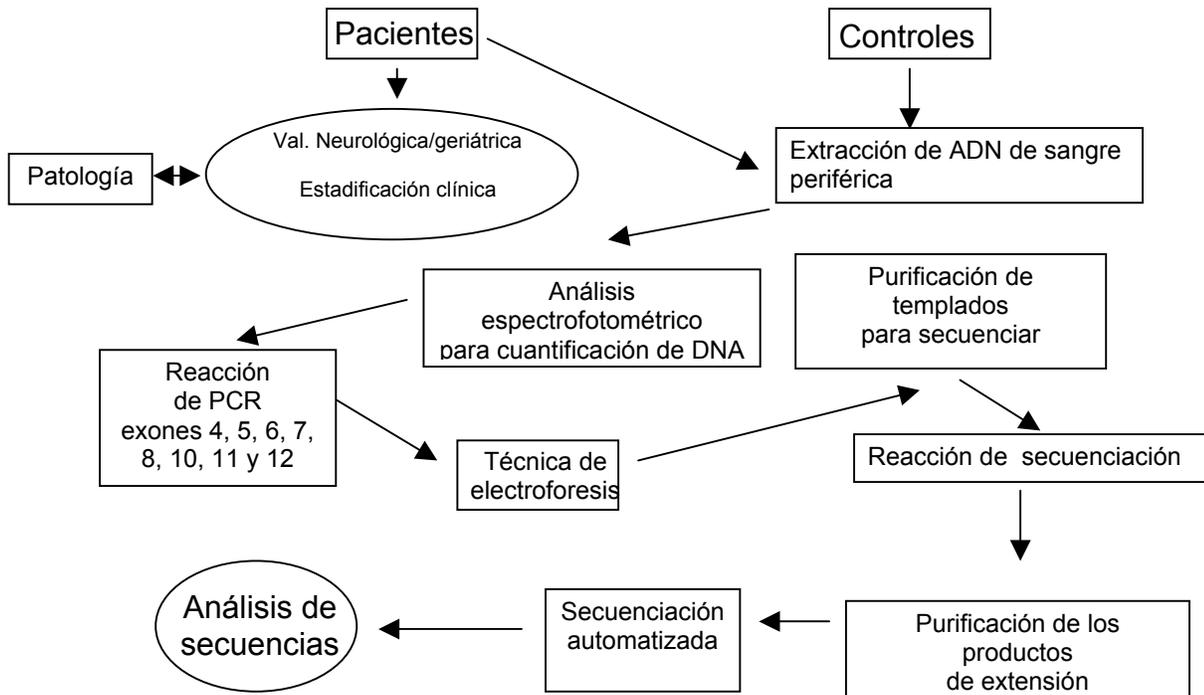
- Pacientes con la enfermedad de Alzheimer de inicio < de 65 años.
- Historia familiar de al menos un afectado de primer grado con EA.
- Diagnóstico histopatológico de EA de al menos un familiar.
- Pacientes cuyos familiares acepten participar en el estudio mediante carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- ❖ Cuando no sea posible realizar todos los procedimientos requeridos de investigación.

5. MATERIALES Y METODOS

PROCEDIMIENTOS GENERALES



EXTRACCION DE DNA DE SANGRE PERIFERICA (147)

- Extraer asépticamente 5 ml de sangre periférica.
- Colocar la sangre en un tubo de ensayo con EDTA.

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

- Nombre completo, institución de procedencia, médico que solicita el estudio, datos clínicos.

PROCEDIMIENTO

Siguiendo la técnica de Cuevas Covarrubias modificada de Buffone y Darlington (147) y de Kempter y Grossbadern (148).

1. Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y agregar un volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10mM-Tritón 1%-Sacarosa 300mM), el Tris con pH 7.6. Invertir el tubo varias veces.
2. Centrifugar a 3000 rpm / 6 minutos; decantar con cuidado.
3. Agregar al botón 1 ml de amortiguador TTS. Agitar resuspendiendo el botón y pasar a un microtubo de 1.5 ml. Agitar hasta homogeneizar.
4. Centrifugar a 10000 rpm / 2 minutos en microcentrifuga. Decantar, añadir 1 ml de amortiguador TTS, resuspender.
5. Centrifugar a 10000 rpm / 2 minutos en microcentrifuga (repetir de dos a tres veces el paso anterior).
6. Al botón limpio agregar 570 μ l de NaCl 5mM. Agitar 2 minutos y colocar 30 μ l de SDS al 10%. Agitar 5 minutos y agregar 200 μ l de NaCl saturado. Agitar 10 minutos.
7. Centrifugar a 11500 rpm / 30 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante a un tubo de 13 x 100mm estéril.
8. Añadir 2 ml de etanol absoluto a -20°C para precipitar el DNA.
9. Tomar el DNA con una varilla de vidrio, enjuagar el DNA con etanol al 70%, dejar evaporar el etanol en condiciones estériles y posteriormente resuspender el DNA en un microtubo con 250 μ l de agua estéril, colocar en baño maría a 60°C durante 2 horas.

ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO, PARA CUANTIFICACION DE DNA
(148)

En cuanto al análisis espectrofotométrico, éste consiste en determinar la absorbancia de una dilución 1:500 de la muestra a dos longitudes de onda (260nm y 280nm). La lectura de 280 corresponde a las proteínas, y la relación 260/280 nos da la pureza de la muestra. A partir de la lectura a 260nm (correspondiente a los ácidos nucleicos), se calcula la concentración de la muestra:

$$\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = A_{260} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$$

$$1 \text{ D.O. } 260 = 50 \mu\text{g de DNA} / \text{ml} = 0.05 \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

La cantidad total de DNA (en μg) se calcula:

$$\text{Mg totales de DNA} = \text{conc. } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) \times \text{volumen total } (\mu\text{l})$$

CONDICIONES GENERALES DE LA REACCION DE PCR (147-148)

	DNA (50- 100ng)	Volumen de reacción	Amortiguador 10X (Cl ₂ Mg)	MgCl ₂ 50mM	dNTPs (10mM)	Oligo F (10mM)	Oligo R (10mM)	Taq 5U/ μ l
Pac.	1-2 μ l	50 μ l	1X	1.5mM	200 μ M	0.2 μ M	0.2 μ M	0.024U/ μ l
C (-)	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Bco.	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Nota: Pac. = Paciente, C(-) = Individuo sano, Bco. = no contiene DNA. En cada tubo colocar 49 μ l de la mezcla de reacción más 1 μ l de DNA. Se utilizó un estuche comercial para PCR de Applied Biosystems.

Para llevar a cabo el análisis molecular de las familias en estudio se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 12) que permitieron mediante la técnica de PCR obtener la secuencia del fragmento de interés. La amplificación fue realizada usando un protocolo de 30 ciclos a 94°C por un minuto, Ta (°C) por 40 segundos, y 72°C por un minuto.

Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los exones de PS1 (149).

Exón (PS1)	Oligonucleótido F Oligonucleótido R	Temperatura de Alineación, Ta (°C)	Tamaño del Producto (pb)
4	5'-AAAGTTCTGTTTTCTTTCCC-3' 5'-GACATCTGTGCATTCTGGAAG-3'	57	131
5	5'-TTCTTGTGCTTATAGAATGAC-3' 5'-AAACKAAACTCATACGTACAG-3'	57	285
6	5'-GTAGAATCTATACCCCATTCAC-3' 5'-CCCAACCATAAGAAGAACAG-3'	57	199
7	5'-TCTGTACTTTTTAAGGGTTGT-3' 5'-ACTTCAGAGTAATTCATCANCA-3'	57	229
8	5'-GGTGGAAATTATTGTACATC-3' 5'-TTATCAGTCTTGGGTTTTACC-3'	57	289
10	5'-CTTTGTGTGTCCAGTGCTTACC-3' 5'-CTGTTAGCTTATAACAGTGACC-3'	54	192
11	5'-CTGTAACTTCCACTTTCTCTTG-3' 5'-CTAAAGGAATCCATGACTTTG-3'	54	242
12	5'-CTTTTTAATATTTGTAACCTTTCC-3' 5'-GCTCTGACACATTCTTATTAGTG-3'	54	182

TECNICA DE ELECTROFORESIS (148)

La electroforesis del DNA es la migración de éste, en base a su carga y al peso al aplicarse un campo eléctrico. Debido a su carga negativa, el DNA migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite visualizar la calidad de la muestra (con el uso de tinción con bromuro de etidio), así como la presencia o ausencia de RNA contaminante y para el análisis de productos de PCR por visualización de la banda deseada.

Procedimiento:

Volumen 50ml.

Para calidad de DNA-gel al 0.8% con 0.4 g agarosa,

Para productos de PCR-gel al 1.5% con 0.75 g de agarosa,

1. En un matraz Erlenmeyer se disuelve la agarosa en 50 ml de TAE 1X (Tris, Acido acético glacial y EDTA), calentando la mezcla en un horno de microondas (restituir el agua que se pierde por evaporación), dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 50°C, colocar 1 gota de bromuro de etidio (0.625 mg / ml) y vaciar en el porta gel.
2. Dejar solidificar en el portagel colocando el peine.
3. Preparar TAE 1X para llenar la cámara.
4. Retirar el peine cuidadosamente para evitar romper los pozos.
5. Colocar el portagel en la cámara de electroforesis y añadir TAE 1X hasta cubrir el gel aproximadamente un milímetro por encima.
6. Mezclar 10µl de producto de PCR con 3 µl de amortiguador de carga.
7. Colocar la muestra en el pozo y utilizar una escalera de 100pb como referencia.
8. Conectar los electrodos a la cámara y encender la fuente de poder a 70 volts.
9. Dejar correr la muestra durante 1 hora (aproximadamente 2/3 del largo del gel de agarosa).
10. Observar en el transluminador de luz ultravioleta.

PURIFICACION DE TEMPLADOS PARA SECUENCIAR (POR ELUSION).
KIT QUIAEX II (QUIMICA VALANER CAT. No. 20051) (147)

Los fragmentos de PCR deben ser purificados antes de la reacción de secuenciación para remover dNTPs, oligonucleótidos, enzima, DNA, etc.

Procedimiento:

1. Cortar la banda de gel y pesarla.
2. Colocar amortiguador QX1 (3 veces en vol. de acuerdo al peso) y QIAEX 5 μ l (resina), mezclar con vortex.
3. Incubar por 10 minutos a 50°C (mezclando la muestra por vortex cada 2 minutos).
4. Centrifugar un minuto a 10000 rpm, decantar.
5. Colocar 500 μ l de amortiguador QX1 mezclar por vortex.
6. Centrifugar un minuto a 10000 rpm, decantar y eliminar los residuos de este buffer.
7. Agregar 500 μ l de amortiguador PE, mezclar por vortex, centrifugar a 10000 rpm un minuto (este paso se realiza dos veces), decantar y eliminar los residuos del amortiguador PE.
8. Secar la muestra por efecto de temperatura a 50°C por 5 minutos.
9. Colocar 20 ml de agua inyectable y mezclar
10. Incubar 10 minutos a 50°C
11. Centrifugar 5 minutos a 10000 rpm y pasar el agua a un microtubo limpio. Cuantificar la cantidad del producto de la PCR purificado, mediante electroforesis en gel de agarosa y un marcador de masa (Invitrogen low DNA mass ladder, 10068-013).

REACCION DE SECUENCIACION (Applied Biosystems) (147)

Por cada reacción, mezcle los siguientes reactivos en un microtubo de 200 μ l previamente etiquetado:

Reactivo	Cantidad (μ l)
Mezcla de reacción "BigDye terminador"	2
Templado 100 ng / μ l	3
Oligonucleótido (10 μ M)	1
Volumen final de la reacción	6

Mezcla de reacción BigDye Terminador (Parte No. 4303152)

- ❖ ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP marcados por fluorescencia
- ❖ Los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)
- ❖ Tris-HCl (pH 9.0), MgCl₂
- ❖ AmpliTaq DNA polimerasa

Ciclos de temperatura

- ❖ 25 ciclos: 96°C 5 minutos; 96°C 30 segundos; 50°C 15 segundos; 72°C 3 minutos; enfriar a 4°C.

Purificación de los productos de extensión

Eliminar los ddNTPs marcados por fluorescencia presentes en exceso, para permitir una secuenciación limpia y evitar errores en la interpretación de resultados. **Método por columnas Centri Sep** (parte No. 401262 Applied Biosystems). Secar la muestra en un concentrador de vacío (no aplicar calor y no secar en exceso).

MONTAJE DE LA MUESTRA

Añadir 10 μ l de formamida

Transferir a una placa de secuenciación y tajarla, colocarlas inmediatamente en hielo.

Colocar las muestras en el secuenciador Automatizado ABI PRISM modelo 310 de acuerdo a las instrucciones del equipo.

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó mediante estadística descriptiva

6. ASPECTOS ETICOS

Se explicaron ampliamente las características del estudio a las familias implicadas y se obtuvo su aprobación mediante la firma de la carta de consentimiento informado. Anexo 17.

7. RESULTADOS

Se analizaron a 2 familias mexicanas referidas por el Servicio de Neurología. En dicho servicio a los casos índice (III-D5 y III-10) se les realizó una exploración neurológica completa que mostró alteraciones cognitivas principalmente de la memoria reciente. Posteriormente y como parte del protocolo para el establecimiento del diagnóstico clínico se les solicitó a ambos pacientes una imagen de resonancia magnética, en la cual se demostró una atrofia cerebral difusa. Con los datos anteriores, aunado al antecedente de hallazgos neuropatológicos (autopsia) de la EA en al menos 1 enfermo de cada familia, se integró el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer; y se decide analizar molecularmente a ambas familias en el Servicio de Genética. Cabe mencionar que dentro del diseño de estudio se ingresarían a las familias que cumplieran los criterios de inclusión (pacientes con la EA de inicio antes de los 65 años, historia de al menos 1 familiar afectado de primer grado con EA, diagnóstico histopatológico de EA de al menos un familiar) para lo cual se realizó una historia clínica genética con elaboración del árbol genealógico para buscar todos esos datos.

FAMILIA I: realizando una historia clínica genética con elaboración detallada del árbol genealógico (tablas 13 y figura 12) se observa que en esta familia hay 5 generaciones de las cuales 3 afectadas (I-III), donde aparentemente el primer enfermo (I-1) lo transmite a la mayoría de sus hijos (II-1, II-2, II-4 y II-5); y éstos a su vez lo heredan a varios de su descendencia (III); por lo tanto, teniendo una forma de herencia autosómica dominante. En suma se observa que hay 16 afectados (4 vivos) que tienen un promedio de edad de inicio de 43.3 años, con un intervalo que va desde los 40 años (I-1, III-A5, III-B4 y III-E1) hasta los 50 años (III-A4); mientras que la duración media de la enfermedad es de 5.6 años (rango desde los 2 a los 10 años); por último la edad de fallecimiento tuvo intervalo desde los 42 años (III-B4) hasta los 55 años (III-A4) con una media de 49.3 años.

FAMILIA II: de forma similar a la primera familia el análisis de la historia clínica y del árbol genealógico (tabla 14 y figura 13) nos demuestra una herencia de forma autonómica dominante donde hay 3 generaciones (I-III) de las 4 afectadas; hay un total de 8 individuos afectados (1 vivo), donde el primero aparentemente es I-2, el cual lo transmite a 2 (II-2 y II-4) y estos a su vez a varios de sus hijos (III). La edad de inicio tiene una media de 45.8 años con un rango desde los 38 años (III-8) hasta los 54 años (III-3). El promedio de sobrevida fue 7.4 años; mientras que la edad de fallecimiento tuvo un intervalo desde los 46 años (III-8) hasta los 60 años (III-2 y III-3) con un promedio de 7.4 años.

El análisis de los “*pedigrees*” permite observar los otros criterios de inclusión que incluyen la edad de inicio antes de los 65 años y un paciente de primer grado afectado en ambas familias. Con estos datos decidimos iniciar en análisis molecular para el gen PSEN-1,

En la Figura 14 se encuentra una electroforesis en la que se observa DNA genómico de alto peso molecular de todos los pacientes analizados en nuestro estudio. En las Figuras 15-20 se muestran las electroforesis de los productos de amplificación de PCR de todos los exones del gen PSEN-1 en varios pacientes de las 2 familias con EA de inicio temprano. La Figura 21 es un análisis de secuencia normal (exón 7 de PSEN-1, Familia I). La Figura 22 análisis de secuencia en la que se muestra un polimorfismo (G/T) en la posición 180 del exón 11 del gen PSEN-1, este hallazgo se encontró en todos los pacientes analizados.

Tabla 13. Familia I con Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano

Familia		SEXO	EDAD DE INICIO	EDAD DE	EDAD ACTUAL	DURACION DE LA
			(AÑOS)	FALLECIMIENTO	(AÑOS)	ENFERMEDAD (AÑOS)
			EI (35-55)	EF	EA	DE
01-GA						
I-1	1 Paciente	M	40	48	--	8
II-1	2 Paciente	F	?	?	--	?
II-2	3 Paciente	M	46	54	--	8
II-4	4 Paciente *	F	43	47	--	4
II-5	5 Paciente	M	43	53	--	10
III-A4	6 Paciente	M	50	55	--	5
III-A5	7 Paciente	M	40	45	--	5
III-A6	8 Paciente	F	44	49	--	5
III-A7	9 Paciente	M	46	51	--	5
III-B1	10 Paciente	F	48	54	--	6
III-B3	11 Paciente	M	41	45	--	4
III-B4	12 Paciente	F	40	42	--	2
III-D4	13 Paciente	M	41		51	10
III-D3	Control 1	F	--		52	--
III-D5	14 Paciente	F	45		49	4
	Control 2	F			46	--
III-D6	15 Paciente	M	43		47	4
III-E1	16 Paciente	M	40		41	1

Fig.12. ARBOL GENELOGICO DE LA FAMILIA 1 CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE INICIO TEMPRANO

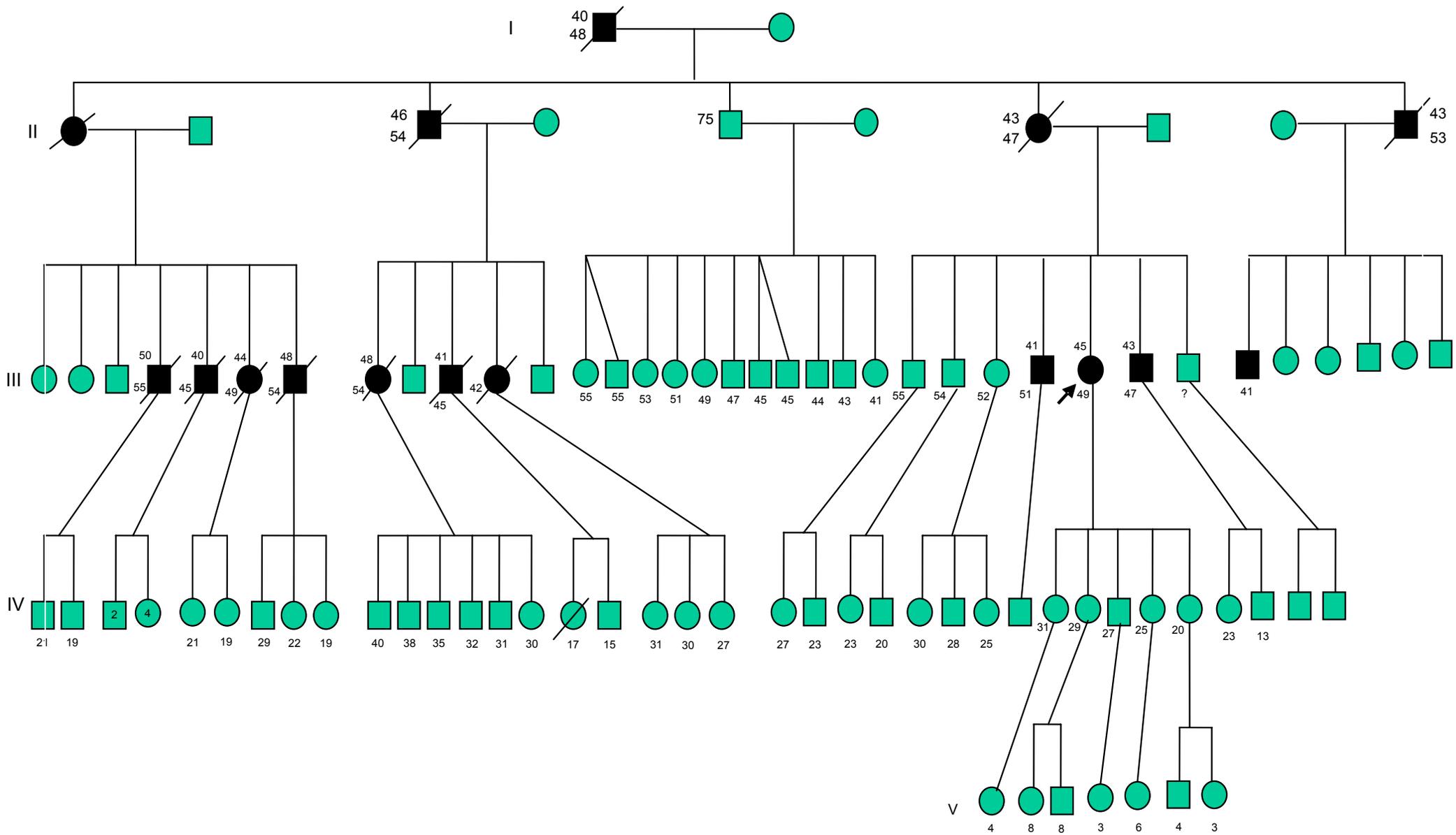
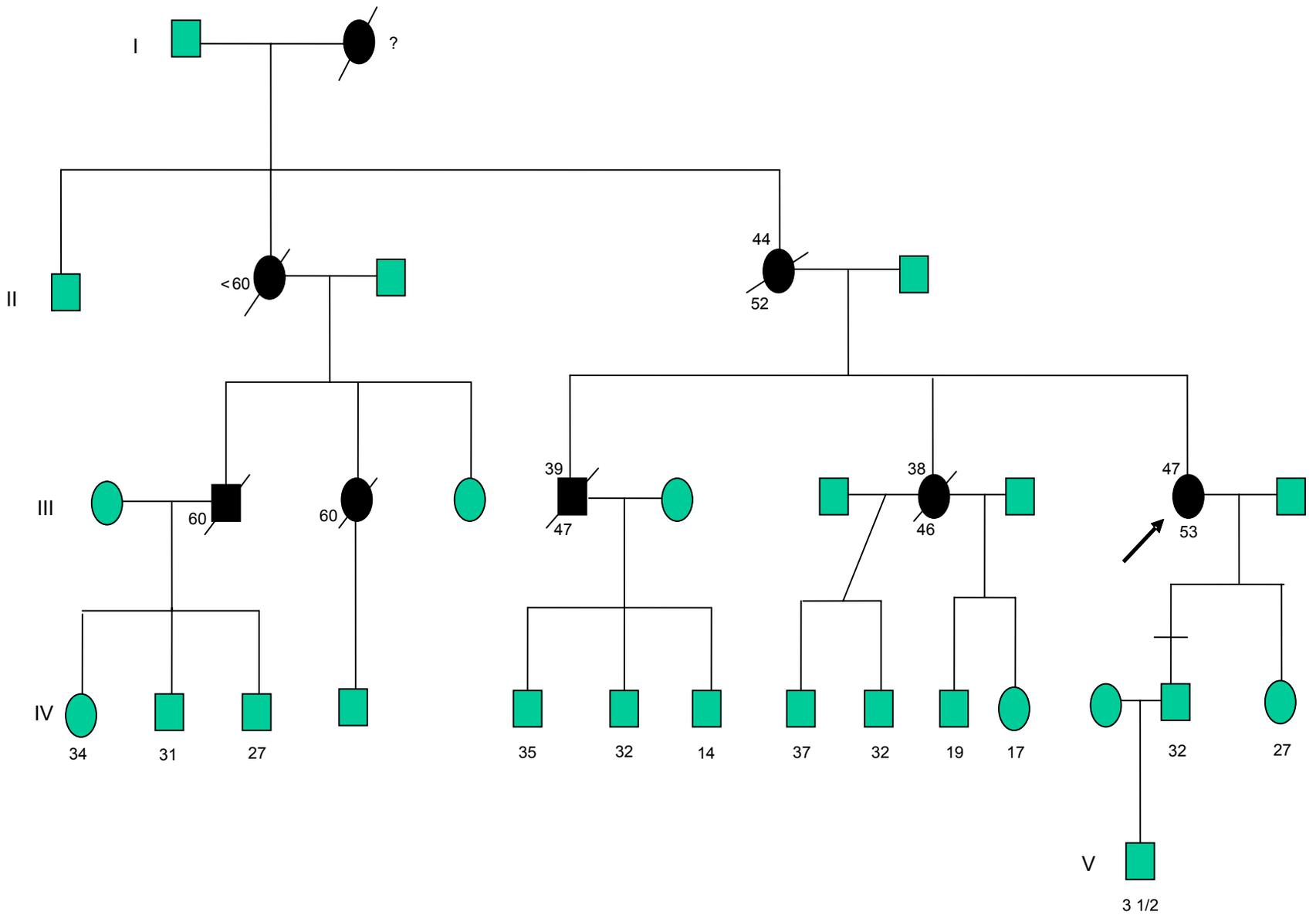


Tabla 14. Familia II con Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano

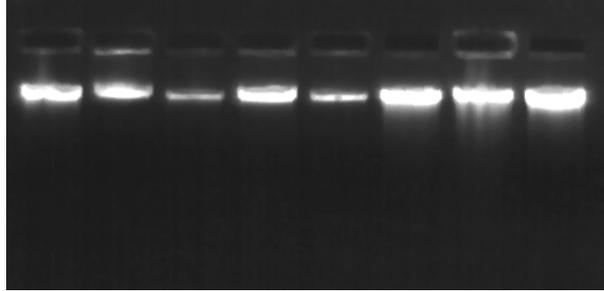
FAMILIA- 02 TG		SEXO	EDAD DE INICIO (AÑOS) EI	EDAD DE FALLECIMIENTO (AÑOS) EF	EDAD ACTUAL (AÑOS) EA	DURACION ENFERMEDAD (AÑOS) DE
I-2	1 Paciente	F	?	?	--	?
II-2	2 Paciente	F	?	<60	--	?
II-4	3 Paciente	F	44	52	--	8
III-2	4 Paciente	M	53	60	--	7
III-3	5 Paciente	F	54	60	--	6
III-5	6 Paciente	M	39	47	--	8
III-8	7 Paciente	F	38	46	--	8
III-10	8 Paciente	F	47	--	53	6
	Control 3	F	--	--	--	

Fig.13. ARBOL GENEALOGICO DE LA FAMILIA II CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE INICIO TEMPRANO



GELES DE AGAROSA CON DNA GENOMICO Y AMPLIFICACION DE EXONES

Fig.14. **DNA Genómico de alto peso molecular**

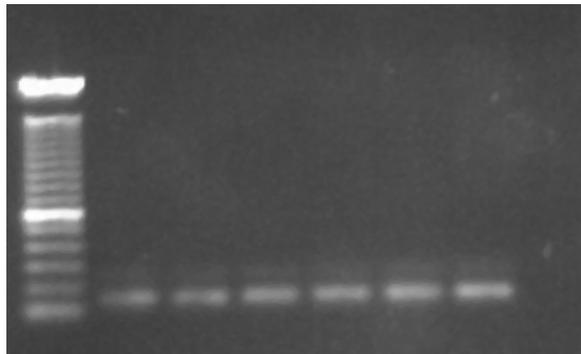


Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio.

Familia I: pacientes (III-D4, III-D5, III-D6 y III-E1) y controles (C1 y C2).
Familia II: pacientes (III-10) y control (C3).

Fig.15. **Amplificación del exón 4 de PSEN-1**

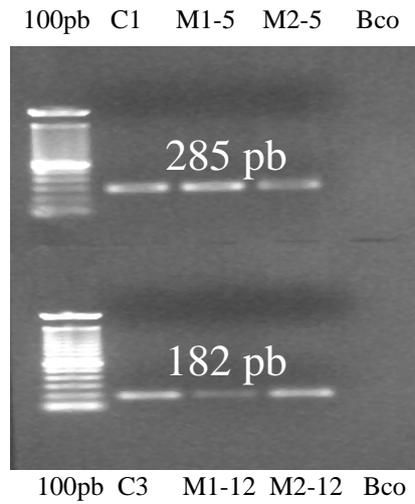
100pb M1 M2 M3 M4 M5 C1 Bco



Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio

M1: paciente III-D4/ Familia I/ exón4
M2: paciente III-D5/ Familia I/ exón4
M3: paciente III-D6/ Familia I/ exón4
M4: paciente III-E1/ Familia I/ exón4
M5: paciente III-10/ Familia II/ exón4
C1: control/exón4
Bco: blanco

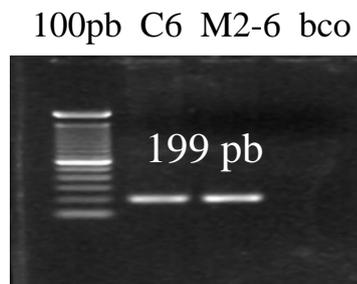
Fig.16. Amplificación de los exones 5 y 12 de PSEN-1



Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio.

C1: control/ exón5
M1-5: paciente familia I/ exón 5
M2-5: paciente familia II/ exón 5
C3: control/ exón 12
M1-12: paciente Familia I/ exón 12
M2-12: paciente Familia II/ exón 12
Bco: blanco

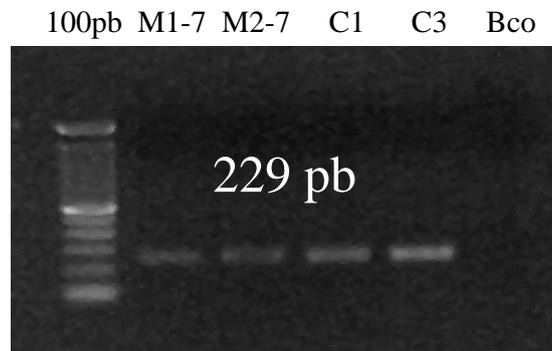
Fig.17. Amplificación del exón 6 de PSEN-1



Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio

C6: control
M2-6: paciente Familia II/ exón 6.
Bco: blanco

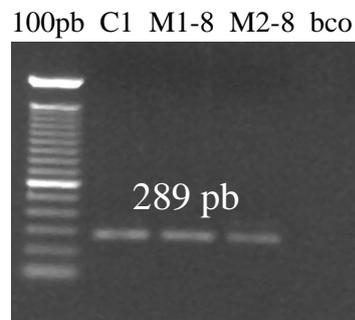
Fig. 18. **Amplificación del exón 7 de PSEN-1**



Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio

M1-7: paciente familia I/ exón 7
M2-7: paciente familia II/ exón 7
C1 y C3: controles
Bco: blanco

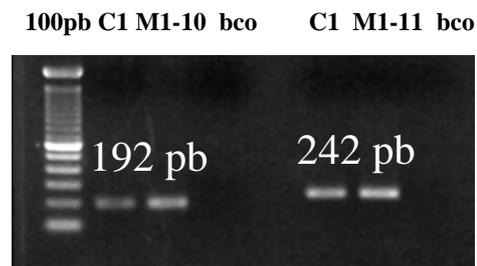
Fig.19. **Amplificación del exón 8**



Gel de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio.

C1: control
M1-8: paciente familia I/ exón 8
M2-8: paciente familia II/ exón 8
Bco: blanco

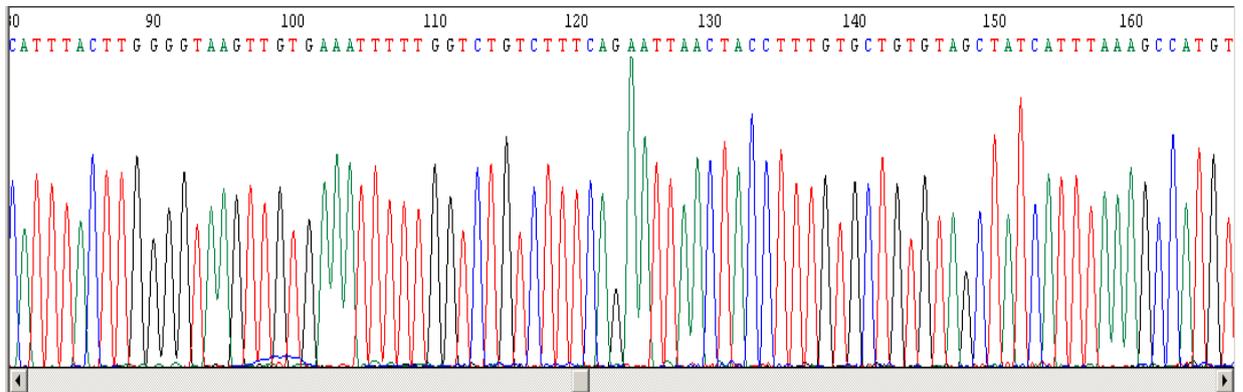
Fig. 20. Amplificación de los exones 10 y 11 de PSEN-1.



Gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio

C1: control
M1-10: paciente familia 1/ exón 10
M1-11: paciente familia 1/ exón 11
Bco: blanco

Fig. 21. Análisis de secuenciación: electroferograma y bioinformática



NCBI Blast 2 Sequences results

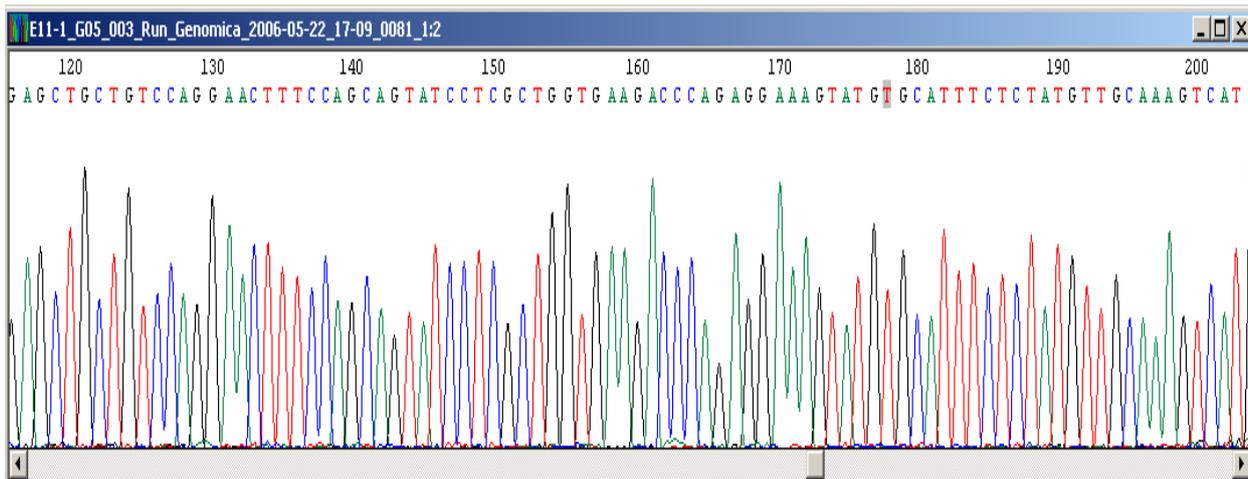
BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSION BLASTN 2.2.14 [May-07-2006]

Score = 166 bits (86), Expect = 2e-38
 Identities = 86/86 (100%), Gaps = 0/86 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 23 TTTTCTGTGAAACAGTATTTCCTATACAGTTGCTCCAATGACAGAGTTACCTGCACCGTTG 82
 Sbjct 46 TTTTCTGTGAAACAGTATTTCCTATACAGTTGCTCCAATGACAGAGTTACCTGCACCGTTG 105

Query 83 TCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTC 108
 Sbjct 106 TCCTACTTCCAGAATGCACAGATGTC 131

Fig. 22. Análisis de secuenciación: electroferograma y bioinformática: Polimorfismo G/T en la posición 180 del exón 11.



Ensembl Genome Browser - Microsoft Internet Explorer

Archivo Edición Ver Favoritos Herramientas Ayuda

Atrás Búsqueda Favoritos

Dirección: http://www.ensembl.org/index.html

Search all Ensembl: Gene PS1 Go

Ensembl release 40 - Aug 2006 Help

Use Ensembl to...

- Run a BLAST search
- Search Ensembl
- Data mining (BioMart)
- Export data
- Download data

Docs and downloads

- Information
- What's New
- About Ensembl
- Ensembl data
- Software

Other links

- Home
- Sitemap
- Vega
- Pre Ensembl
- View previous release of page in Archive!
- Release 39: Jun 2006
- Release 38: Apr 2006

What's New in Ensembl 40

- New low-coverage genomes (*L. africana*, *D. novemcinctus*, *E. telfairi*, *O. cuniculus*)
- Stickleback assembly and genebuild (*Gasterosteus aculeatus*)
- New species - *Aedes aegypti* (*Aedes aegypti*)
- New Macaque assembly and genebuild (*Macaca mulatta*)
- New genebuild on Rat assembly (*Rattus norvegicus*)

[More news...](#)

About Ensembl

Ensembl is a joint project between [EMBL](#) - [EBI](#) and the [Sanger Institute](#) to develop a software system which produces and maintains automatic annotation on selected eukaryotic genomes. Ensembl is primarily funded by the [Wellcome Trust](#).

This site provides [free access](#) to all the data and software from the Ensembl project. Click on a species name to browse the data.

Access to all the data produced by the project, and to the software used to analyse and present it, is provided free and without constraints. Some data and software may be subject to [third-party constraints](#).

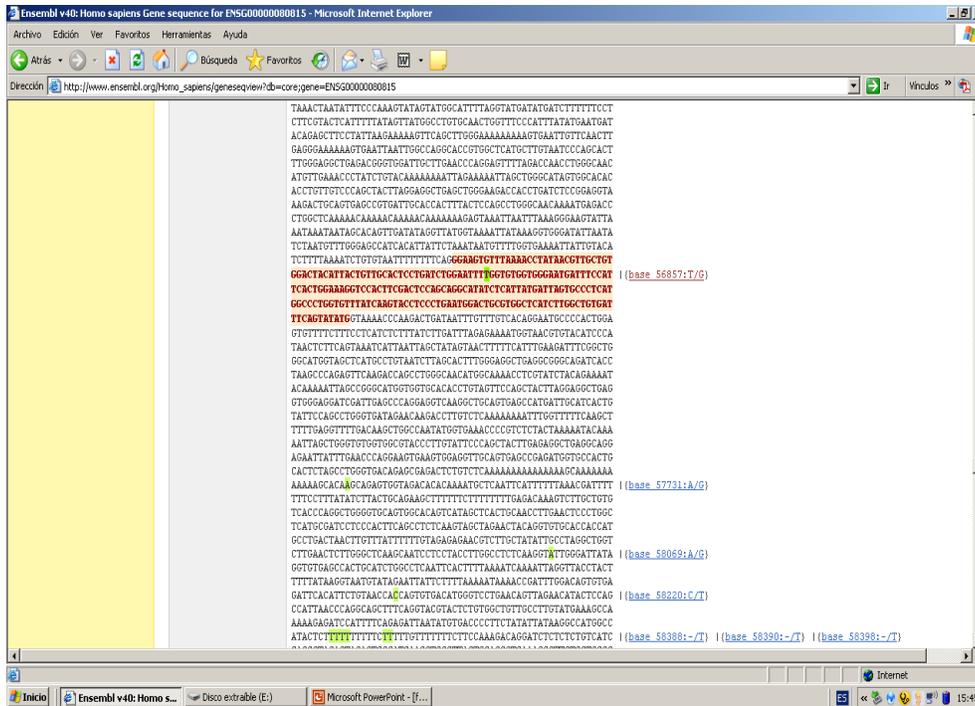
Mammalian genomes

- Homo sapiens**
NCBI 36 | Vega
- Pan troglodytes**
PanTro 1.0 | **NEW!** *pre!*
- Macaca mulatta**
UPDATED! MMUL 1.0
- Mus musculus**
NCBI m38 | Vega
- Rattus norvegicus**
UPDATED! R6SC 3.4
- Oryctolagus cuniculus**
NEW! RABBIT
- Canis familiaris**
CanFam 1.0 | Vega | **UPDATED!** *pre!*
- Bos taurus**
Btau 2.0
- Sus scrofa**
NEW! (clone status map)
- Dasyus novemcinctus**
NEW! ARMA
- Loxodonta africana**
NEW! BROAD E1

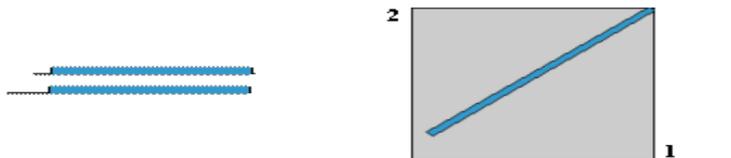
Other species

- Gallus gallus**
WASHUC 1
- Xenopus tropicalis**
Xtr1.1
- Danio rerio**
Zv6 | Vega
- Takifugu rubripes**
FUGU 4.0
- Tetraodon nigroviridis**
TETRAODON 7
- Gasterosteus aculeatus**
NEW! BROAD S1
- Oryzias latipes**
MEDAKA 1
- Ciona intestinalis**
JGI2
- Ciona savignyi**
CSAV 2.0
- Drosophila melanogaster**
UPDATED! BDGP 4
- Anopheles gambiae**
AgamP3

Inicio Yahoo! - Microsoft Inter... Ensembl Genome Bro... Microsoft PowerPoint - [f... E11-1 G05FE - Microsoft ... 16:00



CTGTTGCACCTCCTGATCTGGAATTT[G/T]GGTGTGGTGGGAATGATTTCATTC
 LEE.C et al. 2000



NOTE:Bitscore and expect value are calculated based on the size of the nr database.

NOTE:If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence.



```

Score = 356 bits (185), Expect = 2e-95
Identities = 193/198 (97%), Gaps = 0/198 (0%)
Strand=Plus/Plus

          AGACACTGTTGCAGAGAATGATGATGGCGGGTTCAAGTGAGGAATGGGAAGCCCCAGAGGGA   78
          |||
Sbjct   45  AGACACTGTTGCAGAGAATGATGATGGCGGGTTCAAGTGAGGAATGGGAAGCCCCAGAGGGA   104
Query   79  CAGTCATCTAGGGCCCTCATCGCTCTACACCTGAGTCAAGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTC   138
          |||
Sbjct  105  CAGTCATCTAGGGCCCTCATCGCTCTACACCTGAGTCAAGAGCTGCTGTCCAGGAACCTTC   164
Query  139  CAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCAGAGGAAAGTATGTGCATTTCTCTATGTTGCAA   198
          |||
Sbjct  165  CAGCAGTATCCTCGCTGGTGAAGACCCAGAGGAAAGTATGTTCAATTTCTCCATNTTTCAA   224
Query  199  AGTCATGGATTCCCTTAG   216
          |||
Sbjct  225  AGTCATGGATTCCCTTAG   242
  
```

Cambio G por T, posición 180.

8. DISCUSION

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una condición neurodegenerativa que afecta actualmente a más del 2% de la población y es la causa más común de demencia, constituyendo 2/3 del total de los casos. Debido al envejecimiento cada vez mayor de la población se estima que estas enfermedades también aumentarán paralelamente, de tal forma que para el año 2050 se triplicará su número en un aproximado de 36.7 millones, de lo cuales 10 millones presentarían la EA (23, 150). Avances recientes en la epidemiología de la EA han identificado una serie de factores de riesgo (sexo, consumo de alcohol, tabaquismo, traumatismos craneoencefálicos, educación, enfermedades cardiovasculares, historia familiar, APOE ϵ 4, etc) y protectores (terapia con estrógenos, antiinflamatorios no esteroideos y antioxidantes) que nos dan una base para el entendimiento y comprensión de la relación que guardan los factores genéticos y no genéticos en la patogénesis de la enfermedad. La incidencia y prevalencia de la EA se elevan entre los 65 y 95 años de edad de una forma exponencial con una duplicación cada 5 años, por lo tanto la importancia de este concepto según datos epidemiológicos sería que la demora del comienzo de la EA por 5 años disminuiría la prevalencia a la mitad en personas menores de 90 años. Aunque el promedio de edad de inicio de esta enfermedad es aproximadamente a los 80 años, hay un pequeño porcentaje que inicia tempranamente, el cual es raro y se define arbitrariamente como aquel que ocurre antes de los 60-65 años y tiene una incidencia de 41 por 100000 abarcando un 5% del total de los casos; a pesar de su baja incidencia, hay que darle importancia debido a que existe un porcentaje de casos familiares heredados de forma autosómica dominante, que tienen una alta penetrancia y que han permitido identificar algunas vías críticas para la patogénesis de la enfermedad (150). En varios estudios realizados en las pasadas décadas se estimaba que la supervivencia de la EA era entre 5 y 8 años (23); sin embargo, en algunos reportes recientes basados en los datos del estudio de Framingham (151), Elias et al. extendieron ésta de 13 a 22 años al analizar

sujetos con déficits cognitivos en las fases preclínicas de la enfermedad, antes de que se estableciera el diagnóstico probable de EA.

La principal manifestación clínica de la EA es la demencia que típicamente comienza con cambios sutiles y pobremente reconocidos de la memoria que progresa lentamente hasta ser severa e incapacitante. Evidencias actuales sugieren que el proceso patogénico temprano de la EA puede prolongarse por décadas; en una fase preclínica se han descrito 2 periodos, uno latente donde no pueden ser observados síntomas de la enfermedad y otro prodrómico más corto donde se observan síntomas como alteraciones de la memoria y daño cognitivo pero en forma leve e imposible de predecir un diagnóstico de EA; no obstante, estos pacientes considerados en una etapa denominada “daño cognitivo leve” desarrollarán demencia en una proporción más grande que aquellos controles normales con edad avanzada, de tal forma que el 50% de sujetos con daño aislado de la memoria progresan a EA en el curso de 5 años (75,151-154); la importancia de realizar estos estudios sería establecer una definición más confiable así como un diagnóstico precoz en las fases más tempranas e implementar estrategias preventivas en las fases iniciales de la enfermedad. En esta fase los síntomas se desarrollan insidiosamente y aunque es difícil precisar su inicio, la característica principal de la EA es el déficit en la memoria que se va a manifestar en la etapa temprana como una repetición de preguntas o frases; durante la etapa moderada (con duración de 4-7 años) la información es rápidamente olvidada (aunque la memoria pasada puede ser recordada) para que posteriormente durante la etapa más severa solo queden fragmentos de la memoria. Conforme avanza la EA se pueden observar otras áreas cognitivas afectadas como lo son el juicio, la resolución de problemas, la orientación, el lenguaje hablado y escrito (afasia); del mismo modo y de una forma inconsistente durante el curso de la enfermedad los pacientes pueden sufrir una variedad de síntomas no cognitivos dentro de los cuales destacan la ansiedad (75%), el pensamiento lento (56%), la irritabilidad (51%), la apatía (49%), la tristeza (47%), la culpabilidad (20%) y la depresión mayor (15%). El paciente fallece generalmente por debilitamiento crónico severo (disfagia y pérdida de peso),

embolia pulmonar, neumonía por aspiración y urosepsis (39). Para establecer el diagnóstico clínico nos valemos de varios “tests” dentro de los cuales se encuentran el MMSE (*Minimal State Examination*), el CDR (*Clinical Dementia Rating*) y el NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communitive Disorders and Stroke and the Alzheimer’s disease and Related Disorders Association*); en éstos se exploran distintas áreas cognitivas como lo son la memoria, la atención, el cálculo, la concentración y el lenguaje, de tal forma que por medio de preguntas sencillas se evalúan las respuestas del paciente y se obtiene un puntaje que nos indicará el grado de demencia. En la actualidad no existe un marcador biológico que permita el diagnóstico de la EA, por lo tanto éste recae estrictamente en los criterios clínicos basados fundamentalmente en la constelación de un cuadro clínico compatible y en descartar otras causas de demencia. Aunque muchos estudios reportan una tasa alta de éxito para el diagnóstico clínico de la EA (80-90%), éstos probablemente se emanan por una búsqueda experta de centros académicos y están basados en pacientes que se encuentran en las últimas etapas de la enfermedad quienes fueron seguidos por varios años antes de la conformación por autopsia; por lo tanto, la verdadera tasa de éxito del diagnóstico clínico es posiblemente más baja sobre todo en hospitales generales y en las etapas más tempranas de la enfermedad cuando los síntomas son vagos e indistintos; debido a esto, hay una gran necesidad para buscar biomarcadores que puedan ayudar al diagnóstico temprano de la EA (77). Avances en la tecnología de imagen en las 2 décadas pasadas han tenido un profundo impacto sobre la práctica neurológica y el entendimiento de la enfermedad cerebral y la EA; la imagenología cerebral puede ayudar a localizar las lesiones sospechadas clínicamente, revelarlas antes de que sean totalmente evidentes y algunas veces identificarlas previo a que sean sintomáticas. Actualmente existen datos que apoyan el uso de la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía por emisión simple de fotones (SPECT) como un biomarcador para la EA (sensibilidad y especificidad de 85-95%). Estos estudios revelan imágenes de la distribución de drogas marcadas radioactivamente (que participan en reacciones bioquímicas, interactúan con enzimas o transportadores,

o están ligadas a receptores celulares) y nos dan alguna información anatómica sin que se requiera un cambio estructural mayor para detectar la anomalía, permitiendo así evaluar cualitativa y cuantitativamente la cantidad del marcador en determinadas áreas corporales, siendo un indicador directo de los procesos metabólicos subyacentes en contraposición a la TAC e IRM en los que sólo se refleja la anatomía. En varios de estos estudios se ha demostrado que pacientes con EA tienen un flujo sanguíneo y metabolismo reducidos en la neocorteza temporal y parietal; de tal forma que han inducido a que diversos países industrializados apliquen estas técnicas para la búsqueda y la observación de los mecanismos biológicos, la relación clínica, la fisiopatología, así como una herramienta diagnóstica para monitorear el inicio, la progresión y la respuesta al tratamiento de la demencia (155-160). Aunado a los auxiliares de imagenología, actualmente se intenta detectar las características fisiopatológicas de los fluidos biológicos como es la sangre, el plasma y el líquido cefalorraquídeo (LCR) a causa de las profundas alteraciones bioquímicas, patológicas y de los procesos celulares del metabolismo de la PPA y otras moléculas presentes en el cerebro de los pacientes con EA. Los biomarcadores en sangre y plasma no son consistentes, fáciles de reproducir, sensitivos ni diagnósticos para la EA; no obstante las mediciones en el metabolismo de la PPA ($A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$), la inflamación (PCR, IL- 1β , IL-6), el metabolismo del colesterol (24S-hidroxicolesterol), el estrés oxidativo y la homeostasia de la homocisteína parecen estar alterados en estos fluidos en la EA comparado con los controles sanos; por lo tanto en un futuro cercano nos ayudarían como auxiliar diagnóstico sobre todo por ser métodos menos invasivos y más rápidos de realizar. Por otro lado, dado que el LCR está en contacto directo con el espacio extracelular cerebral, los cambios bioquímicos en el cerebro están reflejados en este fluido, por lo tanto es una fuente obvia para marcadores en la EA que podrían mostrar los procesos patogénicos centrales del desorden (por ejemplo, la degeneración neuronal, el disturbio en el metabolismo del péptido amiloide y su posterior depósito en las PN y la hiperfosforilación de tau con la subsecuente formación de las MNF). Los biomarcadores sugeridos para estos procesos son la proteína tau normal y fosforilada así como el péptido $A\beta_{42}$ que

tienen una sensibilidad y especificidad del 80-90%. Actualmente los marcadores del LCR tienen un papel importante en el trabajo clínico de pacientes con demencia si son utilizados junto con la información obtenida de la exploración física y las técnicas de imagen cerebral (161-162).

Algunas regiones cerebrales involucradas en el proceso de la memoria y el aprendizaje como los lóbulos temporal y frontal (principalmente la corteza entorrinal, el hipocampo, cerebro basal y la amígdala) se encuentran atroficos en los pacientes con la EA como resultado de la degeneración de la sinapsis y la muerte neuronal. A causa de que pueden encontrarse otras etiologías que deterioran la memoria, el diagnóstico definitivo de la EA requiere del examen anatomopatológico cerebral *postmortem*, el cual debe contener suficiente número de PN y MNF para calificar a un paciente como afectado por la enfermedad. Las PN son depósitos extracelulares de fibrillas y agregados amorfos del péptido β amiloide ($A\beta$); mientras que las MNF son agregados fibrilares intracelulares de la proteína asociada a microtúbulos (tau) que exhiben hiperfosforilación y modificaciones oxidativas (117).

El punto central de la EA es una alteración del procesamiento proteolítico de la PPA (hipótesis amiloidea) debido a mutaciones en los genes PPA, PS-1 o PS-2, las cuales aumentan la actividad β o γ secretasa que resultan en la producción y la agregación de formas neurotóxicas de $A\beta$ que son los productos que inducen la degeneración neuronal, el daño sináptico y la apoptosis, al incrementar el daño oxidativo, las alteraciones del metabolismo energético, las perturbaciones de la homeostasis del calcio y la fosforilación de las MNF (117, 135-136). En los últimos años ha surgido una corriente que desafía esta hipótesis en cuanto a su papel como llave patogénica para la enfermedad y señalan que el péptido β amiloide tiene un papel protector; se sabe que el mecanismo más precoz de la EA es el estrés celular que incluso precede e incrementa la formación de $A\beta$, el cual a su vez disminuye dicho estrés, sugiriéndose de esta forma que el péptido tiene un "role" protector y por lo tanto actúa como un potente antioxidante natural endógeno del tipo superóxido dismutasa; esto tiene la importancia desde el punto de vista de

farmacológico en cuanto a que la remoción o disminución en la producción del β amiloide empeoraría la enfermedad (163).

Las causas de la EA son complejas. La mayoría de los casos reflejan un modo de herencia multifactorial (75%) donde hay una interacción entre factores genéticos desconocidos y ambientales. Un 1% corresponde a causas cromosómicas (síndrome de Down) donde todos los pacientes desarrollan hallazgos neuropatológicos y déficit cognitivo después de los 40 años; la razón para esta asociación es la sobreexpresión del gen PPA que se encuentra sobre el cromosoma 21 y que codifica para la proteína precursora de amiloide que resulta en la sobreproducción del $A\beta$ amiloide en los cerebros de quienes tienen esta trisomía. Cerca de un 25% de la EA es familiar, esto significa que 2 o más personas en una familia tienen la enfermedad; son casos que tienen los mismos fenotipos clínicos y patológicos que los que no son familiares y solo son distinguidos por una cuidadosa historia clínica y por los estudios moleculares. Se han identificado 2 tipos de enfermedades familiares, dependiendo por supuesto de la edad de inicio de ésta; una EA de inicio tardío (15-23%) cuyo diagnóstico es realizado en familias con múltiples casos de EA en la cual el promedio de edad de comienzo es mayor a los 65 años. Varias investigaciones han apoyado el concepto que esta enfermedad de inicio tardío puede involucrar varios genes de susceptibilidad, dentro de los cuales el mejor estudiado es el alelo $APOE\epsilon_4$, aunque la presencia de éste no es suficiente para establecer el diagnóstico de EA. Este genotipo se encuentra en un 1% de la población normal y en casi 19% de la población familiar con la EA. Contrario, el alelo $APOE\epsilon_2$ se ha observado que tiene un efecto protector para el riesgo de la enfermedad (164). Otros genes de susceptibilidad están actualmente bajo investigación dentro de los cuales se encuentran la α_2 macroglobulina (cromosoma 12), $GSTO1$ y $GSTO2$ (10q), LRP (proteína relacionada a la lipoproteína de baja densidad), NEP (neprilisina), ECE (enzima convertidora de endotelina), ACE (enzima convertidora de angiotensina), IDE (enzima degradadora de insulina), $CYP46$ (colesterol 24S-hidroxilasa), $GAPD$ (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenada), NOS (óxido nítrico sintasa), etc. (77, 165-175).

Por otro lado, usualmente la EA familiar de inicio temprano (2-5%) es diagnosticada en familias que tienen más de un miembro afectado (usualmente varias personas enfermas en más de una generación) en la cual la edad de comienzo se encuentra antes de los 60-65 años (hablando estrictamente, un 61% de los individuos con EA de inicio temprano tienen una historia familiar y 13% tienen pacientes afectados en al menos 3 generaciones). La EA familiar de inicio temprano es heredada de una forma autosómica dominante, por lo tanto, la mayoría de los individuos enfermos tienen un padre afectado; ocasionalmente cuando ninguno de éstos están afectados, un pariente de segundo grado (tíos, abuelos) puede presentar o tuvo la enfermedad. Basados en los mecanismos genéticos han sido identificados tres subtipos clínicamente indistinguibles de EA familiar de inicio temprano: la EA tipo 1 (EA1) causada por mutaciones en el gen PPA (10-15%), el cual codifica la proteína precursora de amiloide; la EA tipo 3 (EA3) es causada por mutaciones en PSEN1 (30-70%), el gen que codifica para la proteína presenilina 1; y la EA tipo 4 (EA4) es causada por mutaciones en el gen PSEN2 (5%), el cual codifica la proteína presenilina 2. Han sido descritas formas autosómicas dominantes de EA de inicio temprano que no han identificado mutaciones en estos genes, por lo tanto es probable que exista heterogeneidad genética u otros factores causantes de la patología. Es importante señalar que en diversos estudios 20-70% de todas las familias de EA con inicio temprano tienen mutaciones en cualquiera de los genes antes referidos, siendo la más común la de PSEN1; la frecuencia de tales mutaciones en casos esporádicos de EA de inicio temprano parece ser menor al 5% (176).

En la EA3 (por mutaciones en PSEN1) la edad de comienzo es usualmente en los 40's o tempranamente en los 50's, la duración de la enfermedad es de 6-7 años como promedio y tiene una penetrancia completa sin que se haya descrito fenómeno de anticipación hasta la fecha. El gen PSEN1 tiene una región codificante compuesta por 10 exones (3-12) y puede tener *splicing* alternativos en los exones 8 y parte del 3. Todas las mutaciones encontradas hasta la fecha son de sentido equivocado, con excepción de la eliminación de un sitio de *splicing* en el cual el exón 9 se pierde y la proteína es 29 aminoácidos más corta; pueden

encontrarse en cualquier punto siendo los más frecuentes los exones 5, 7 y 8. El producto contiene 467 aminoácidos que abarca 7 a 10 dominios transmembranales hidrofóbicos. La proteína actúa como parte del sistema gamma secretasa para la escisión de la PPA y un producto anormal resulta en un incremento en la producción de isoformas más grandes del péptido beta amiloide el cual es neurotóxico y se autoagrega.

En nuestro estudio incluimos a 2 familias con EA de inicio temprano que cumplieron con todos los criterios de inclusión (diagnóstico histopatológico de al menos un familiar, inicio de la enfermedad antes de los 65 años, al menos un afectado de primer grado). Los propósitos fueron inicialmente evaluados en el servicio de Neurología en donde se les practicó una exploración neurológica detallada analizando las funciones cognitivas, principalmente la memoria; posteriormente se les realizó una imagen de resonancia magnética que reveló en ambos casos atrofia cerebral difusa; ya con estos parámetros se llegó al diagnóstico de probable demencia tipo Alzheimer y fueron enviados a nuestro servicio. Se les realizó una historia clínica con elaboración de árboles genealógicos, en éstos se pueden observar que en ambas familias existe una transmisión vertical, esto quiere decir que el carácter aparece en todas las generaciones (en las primeras 3 por la edad de inicio entre los 30-65 años) y se transmite a través de un individuo afectado. Por ejemplo, en nuestra primera familia el paciente I-1 es aparentemente el primer afectado, éste tuvo 5 hijos, de los cuales 4 padecen la enfermedad (II-1, II-2, II-4, II-5), y éstos a su vez también tienen varios hijos afectados. Otra característica de los árboles es que la enfermedad la presentan ambos sexos y existe la transmisión varón-varón (familia I). Con estos rasgos en los árboles genealógicos llegamos a la conclusión clínica que se trata de una forma familiar de EA de inicio temprano con patrón de herencia autosómica dominante, donde cada individuo afectado tiene un riesgo de 50% de heredar el carácter a su descendencia cuando se une con una persona sana (el diagnóstico definitivo se realizó por la confirmación histopatológica en algún familiar afectado) (177).

En la Familia I el análisis de la historia clínica y del árbol genealógico reveló 16 individuos afectados (actualmente 4 vivos que son objeto de nuestra investigación) que abarcan 3 generaciones. El promedio de edad de inicio de la enfermedad en esta familia fue de 43.3 años (fueron tomados todos los enfermos excepto el II-1 en el cual se desconocen los datos), siendo la edad más temprana a los 40 años (I-1, III-A5, III-B4 y III-E1) y la más tardía a los 50 (III-A4). La edad de fallecimiento tuvo un promedio de 49.3 años, con intervalos que fueron desde los 42 (III-B4) hasta los 55 años (III-A4). La duración de la enfermedad va desde 2 (III-B4) hasta 10 años (II-5) con un promedio de 5.6 años. En la familia II se observó 3 generaciones involucradas, 8 enfermos (uno vivo). La edad de inicio fue variable siendo la más temprana a los 38 años (III-8) y la más tardía a los 54 (III-3), teniendo un promedio de 45.8 años. La edad de fallecimiento tuvo un promedio de 53.0 años con intervalos que fueron desde los 46 años (III-8) hasta los 60 años (III-2 y III-3). El promedio de sobrevivencia fue de 7.4 años. En familias con mutaciones en el gen PSEN1 la edad de inicio se encuentra entre los 40's o tempranamente en los 50's, aunque han sido reportado desde la cuarta hasta la séptima décadas de la vida (de forma muy similar ocurre con la enfermedad producida por mutaciones en el gen PPA). La EA 4 tiene una edad de comienzo con un rango más amplio que las dos anteriores (40-75 años). La duración de la enfermedad en la EA 3 es de 6-7 años (184). Nuestras dos familias muestran una edad de inicio y una sobrevivencia que son concordantes con aquellas familias en las cuales se han encontrado mutaciones en las PSEN-1 y PPA.

Por estos motivos y debido a que las dos familias cumplían con los criterios de inclusión, se decidió hacer el análisis molecular del gen PSEN-1. Como mencionamos antes, éste gen es la causa más frecuente de mutaciones (hasta 70%) en la EA familiar de inicio temprano (76-78). En una primera parte de nuestro proyecto se analizaron los exones 5, 8 y 12. Los motivos por los cuales se eligieron los 2 primeros exones (E-5 y E-8) se debió a que son los más frecuentemente involucrados, representando un 35-40% del total de mutaciones dentro de la PSEN-1; y el exón 12 se incluyó a causa de un reporte realizado por el grupo mexicano encabezado por Alonso M.E del Instituto Nacional de

Neurología en la cual encontraron mutaciones en el gen PSEN-1 en la población mexicana (sustitución Ala431Glu en el codón 431 del exón 12) en 8 familias (30 individuos) de 15 familias (53.3%). Al resultar negativos nuestros estudios en dichos exones, en una segunda parte de nuestro proyecto se incluyeron el resto de la secuencia codificante de PSEN-1 donde se encontró un polimorfismo (G/T) en la posición 180 del exón 11 en todos los pacientes analizados; este polimorfismo fue reportado en el año 2000 por investigadores del Departamento de Genética de la UCLA (178-179). La “variómica” es el estudio bioinformático del varioma; y éste es el conjunto total de variación encontrada en poblaciones de especies que tienen cambios evolutivos relativamente cortos. Un proyecto propuesto en mayo del 2006, “El Proyecto del Varioma Humano (HVP), intenta identificar y registrar todas las variaciones humanas relevantes para enfermedades genéticas raras y comunes; en la práctica puede ser la suma de los SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido). Los SNPs son variaciones en la secuencia del DNA que ocurren cuando un único nucleótido (A, T, C o G) en la secuencia del genoma esta alterado. Para que una variación sea considerada como un SNP, debe ocurrir en al menos un 1% de la población, denominándose a éste como alelo de menor frecuencia. Los SNPs comprenden cerca del 90% de toda la variación genética humana, ocurriendo cada 100-300 bases a lo largo de los 3 billones de bases del genoma humano; se encuentran dentro de las secuencias codificantes, no codificantes o intergenéticos. Los SNPs dentro de las secuencias codificantes no necesariamente cambiarán la secuencia de aa del péptido debido a que el código genético es redundante; no obstante, los que se encuentran en las regiones no codificantes pueden tener consecuencias al alterar el “*splicing*”, la unión a factores de transcripción o la secuencia no codificante del RNA; de esta manera pudiendo ser factores que predisponen a la enfermedad. Otro punto a destacar, es que los SNPs ocurren frecuentemente a través del genoma y tienden a ser relativamente estables y por lo tanto sirven como excelentes marcadores biológicos. Estos últimos son segmentos de DNA con una localización física identificada que son fácilmente rastreados y usados para la

construcción de un mapa cromosómico que muestra la posición de genes conocidos.

Para explicar los resultados negativos de nuestros estudios, revisaremos varias investigaciones realizadas previamente, las cuales analizan casos similares que tienen una gran variabilidad en la frecuencia mutacional y una considerable controversia. Hutton y Hardy (1997), analizaron 19 familias con EA autosómica dominante (ADEOAD), y detectaron mutaciones en PSEN-1 y PPA en todos los pacientes (90); mientras que Cruts M. et al. (1998) realizaron un análisis mutacional de todos los exones y la 5'UTR de PSEN1 y PSEN-2; entre los casos familiares hubo 11 pacientes que cumplieron los criterios completos para la ADEOAD (3 pacientes en 2 generaciones con el diagnóstico clínico de EA), sólo en 2 casos fue encontrada una mutación en PSEN-1, resultando en una frecuencia de 18% de ADEOAD (180). Campion D. et al. (1999) estudiaron 34 familias con ADEOAD (ocurrencia de al menos 3 casos de EA de inicio temprano en 3 generaciones) donde encontraron 16 mutaciones de sentido equivocado del gen PSEN-1 en 19 familias (56%) (181). Kowalska A. et al. (2003) examinó una muestra de 55 pacientes con formas familiares y esporádicas de EA de inicio temprano para buscar mutaciones en el gen PSEN-1; 5 pacientes (11%) resultaron positivos para mutaciones en este gen; no obstante cuando el análisis estuvo restringido a casos familiares con una historia clínica positiva de ADEOAD aumentó a 50% (3 de 6) (182). Janssen et al. (2003) encontró mutaciones en PSEN-1 en 17 de 31 familias (55%) con ADEOAD (183). Existe una gran variabilidad en estos estudios y ésta puede ser debida en parte a los criterios de inclusión que cada investigador utiliza; en la mayoría de los reportes el porcentaje de mutaciones para los 3 genes en la ADEOAD está por debajo del 25%, se estima que del total de casos de inicio temprano de EA(2-5%) el 61% tienen una historia familiar positiva, y solamente un 13% de éstos reúnen los criterios para considerarlos como formas autosómicas dominantes (que son las formas más propensas a mutaciones en alguno de los 3 genes) (184).

Otras explicaciones que pueden surgir por nuestros resultados negativos son las mutaciones de los otros 2 genes causantes de la EA de inicio temprano (PPA y

PSEN-2) que acontecen para aproximadamente un 15-20% del total de los casos. La ausencia de mutaciones en PSEN-1, PSEN-2 y en PPA puede ser explicado por alteraciones en la secuencia fuera de las regiones que se analizaron o por otras causas y genes de riesgo para la EA familiar de inicio temprano. Variaciones genéticas en las secuencias promotoras que alteran la expresión de genes, juegan un papel importante en incrementar la susceptibilidad de las enfermedades complejas. Varios polimorfismos en las regiones promotoras de PSEN-1 y PPA han sido descritos; un polimorfismo 48 C/T en el promotor PSEN-1 se ha asociado con aumento del riesgo genético en la EA de inicio temprano por influencia en la expresión de este gen y del péptido A β amiloide (184). La expresión de los niveles de PPA están esencialmente regulados por la región promotora y reguladora 5' "corriente arriba" y está correlacionado con los niveles del péptido A β en los cerebros de pacientes con EA; Theuns et al. (2006) secuenciaron las regiones promotoras proximales y dos funcionales distales de PPA en pacientes con EA que tuvieron un inicio de su sintomatología antes de los 70 años; encontraron 3 mutaciones que mostraron un aumento de casi 2 veces la actividad transcripcional de la PPA neuronal. Se propone que estas mutaciones eliminaron o crearon sitios de unión a factores de transcripción involucrados en el desarrollo y diferenciación del SNC; de esta forma, las mutaciones en la promotora incrementan de manera significativa la expresión de los niveles de PPA (185). También se han descrito varias mutaciones en el intrón 4 en el sitio de *splicing* que producen 3 transcritos diferentes, dos de estos se producen por deleciones y el restante por inserción. En la deleción cambia el marco de lectura abierto, resultando en un codón de alto prematuro que originará una proteína truncada, por lo que se propone un mecanismo de haploinsuficiencia; mientras que la inserción produce una proteína con un aminoácido extra. En ambos casos, existe un aumento (3.4 veces) en la secreción de A β 42 (186-187). Debido a la baja frecuencia de mutaciones en ADEOAD, diversos autores proponen que existen otros genes involucrados, dentro de los cuales destacan en una pequeña fracción de los casos la presencia del alelo de APOE ϵ 4 o un polimorfismo en el promotor de este gen (180, 183).

En conclusión, la importancia de este estudio radica en que es uno de los primeros que analiza molecularmente (PSEN-1) las familias mexicanas con EA de inicio temprano y servirá como una base para permitir un diagnóstico más rápido y un asesoramiento genético adecuado en todas las familias en las que se sospeche clínicamente o se tenga un antecedente familiar (autopsia) para pensar en la EA de inicio temprano. Por otro lado, se deben estandarizar las técnicas moleculares para el análisis de las regiones codificantes de PSEN-2 y PPA, así como de sus secuencias no codificantes (promotores) para incluirla a los estudios genético-moleculares para poder así analizar los 3 genes conocidos actualmente como factores etiopatogénicos de la enfermedad. Reiteraré que las mutaciones en esta enfermedad solo se detectan en un 20-25% de las familias estudiadas, por lo cual se piensa que existan otros factores genéticos y no genéticos que puedan participar en una vía común desconocida que dispare el comienzo de esta enfermedad.

Anexo1. Criterios Clínicos Diagnósticos para la EA (DSM IV, NINCDS-ADRDA)

DSM-IV dementia of the Alzheimer type (4)	NINCDS-ADRDA probable Alzheimer disease (2)
Development of multiple cognitive deficits: Memory impairment At least one of the following: Aphasia Apraxia Agnosia Disturbed executive functioning (planning, organizing, sequencing, abstracting) Course characterized by continued gradual cognitive and functional decline Deficits sufficient to interfere significantly in social and occupational functioning and representing a decline from past functioning Other causes (medical, neurological, psychiatric) of dementia excluded	Dementia established by examination and documented by objective testing Deficits in two or more cognitive areas Progressive worsening of memory and other cognitive functions No disturbance in consciousness Onset between 40 and 90 years of age Absence of systemic disorders or other brain diseases that could account for the progressive deficits in memory and cognition Diagnosis supported by: Progressive deficits in language (aphasia), motor skills (apraxia), and perception (agnosia) Impaired activities of daily living and altered patterns of behavior Family history of similar disorders Consistent laboratory results (e.g., cerebral atrophy on computed tomography)

Anexo 2. MINIMENTAL STATE EXAMINATION (MMSE)

Este estudio examina el rendimiento cognitivo, evaluando aspectos relevantes de esta función como lo son: la orientación en el espacio y tiempo, la memoria de fijación y la reciente, la atención, el cálculo y el lenguaje. Es un examen que se realiza en 5 minutos (39).

- ❖ El MMSE es dividido en 2 secciones: la primera de las cuales solo requiere respuestas orales y cubre orientación, concentración, memoria y atención; la puntuación máxima es 21. La segunda parte evalúa la capacidad verbal y escrita, escribir una oración espontánea, y copiar un polígono.
- ❖ Puntuación. Ver las siguientes tablas

Orientación	10
Concentración	3
Atención y cálculo	5
Memoria	3
Lenguaje	9
Total	30

Valoración por
función cognitiva
del MMSE

TOTAL DE PUNTOS	INTERPRETACION
30-25	Normal/control
24-20	Leve/incipiente
19-16	Moderado
15 ó menos	Severo

Valoración e
interpretación del
MMSE

Anexo 3. CLINICAL DEMENTIA RATING (CDR)

Este examen evalúa cada una de las 6 categorías cognitivas: memoria, orientación, juicio y solución de problemas, asuntos sociales, hogar y pasatiempo, y cuidado personal. (40). Ver la tabla.

PUNTUACION

- 0 = normal
- 0.5 = Daño cuestionable
- 1 = Daño leve
- 2 = Daño moderado
- 3= Daño severo

Criterios para la CDR

	Impairment				
	None 0	Questionable 0.5	Mild 1	Moderate 2	Severe 3
Memory	No memory loss or slight inconstant forgetfulness	Consistent slight forgetfulness; partial recollection of events; "benign" forgetfulness	Moderate memory loss; more marked for recent events; defect interferes with everyday activities	Severe memory loss; only highly learned material retained; new material rapidly lost	Severe memory loss; only fragments remain
Orientation	Fully oriented	Fully oriented except for slight difficulty with time relationships	Moderate difficulty with time relationships; oriented for place at examination; may have geographic disorientation elsewhere	Severe difficulty with time relationships; usually disoriented to time, often to place	Oriented to person only
Judgment and Problem Solving	Solves everyday problems and handles business and financial affairs well; judgment good in relation to past performance	Slight impairment in solving problems, similarities, and differences	Moderate difficulty in handling problems, similarities, and differences; social judgment usually maintained	Severely impaired in handling problems, similarities, and differences; social judgment usually impaired	Unable to make judgments or solve problems
Community Affairs	Independent function at usual level in job, shopping, and volunteer and social groups	Slight impairment in these activities	Unable to function independently at these activities although may still be engaged in some; appears normal to casual inspection	No pretense of independent function outside home Appears well enough to be taken to functions outside a family home	Appears too ill to be taken to functions outside a family home
Home and Hobbies	Life at home, hobbies, and intellectual interests well maintained	Life at home, hobbies, and intellectual interests slightly impaired	Mild but definite impairment of function at home; more difficult chores abandoned; more complicated hobbies and interests abandoned	Only simple chores preserved; very restricted interests, poorly maintained	No significant function in home
Personal Care	Fully capable of self-care		Needs prompting	Requires assistance in dressing, hygiene, keeping of personal effects	Requires much help with personal care; frequent incontinence

VALORACION DE LA PUNTUACION

Individuos con una calificación de ≥ 1 muestran claros signos de demencia. Calificación de 0.5 pueden experimentar signos tempranos de demencia.

Anexo4. NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL AND COMMUNICATIVE DISORDERS AND STROKE AND THE ALZHEIMER'S DISEASE AND RELATED DISORDERS ASSOCIATION (NINCDS-ADRDA)

Un grupo de trabajo sobre el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer fue establecido por el NINCDS y la ADRDA; éstos establecieron los criterios clínicos para el diagnóstico de la EA para su aplicación en protocolos de investigación, así como para describir aproximaciones que serían útiles para evaluar la historia natural de la enfermedad (41).

Estos criterios establecen 3 niveles de diagnóstico:

Probable EA: se establece cuando la demencia está caracterizada por un comienzo gradual y progresivo, cuando los déficit detectados por una exploración neurológica y exámenes de laboratorio y de gabinete están presentes en 2 o más áreas cognitivas y cuando otras enfermedades cerebrales y sistémicas que puedan causar demencia están ausentes.

Posible EA: es diagnosticado cuando el paciente tiene variaciones en la presentación de la demencia (por ejemplo disfunción del lenguaje de temprano curso) o cuando otra enfermedad que cause demencia esta presente pero se cree que no es la causa primaria responsable para la demencia.

Definitiva EA: esta reservada para EA diagnóstica clínicamente y con confirmación histopatológica por “biopsia cerebral” o autopsia (42).

Anexo 5. **CERAD (75-77)**

Los criterios establecidos por el CERAD y los de Khachaturian para el diagnóstico histopatológico se basan en un número específico de PN relacionados con la edad y un grado limitado de MNF en la neocorteza.

❖ Muestra de tejido:

- 1) Giro frontal medio (área 9).
- 2) Giro temporal superior y medio (áreas 21 y 22).
- 3) Lóbulo parietal inferior (áreas 39/40-partes 7 y 19).
- 4) Giro singular anterior (área 24).
- 5) Hipocampo.
- 6) Amígdala y corteza entorrinal.
- 7) Parte media del cerebro incluyendo la sustancia negra.
- 8) Es posible la realización de secciones adicionales.

❖ Técnicas histológicas:

- Se recomienda Bielschowsky, pero se aceptan otras alternativas.

❖ Criterios diagnósticos:

- 1) Evaluación de placas neuríticas.
- 2) Evaluación semicuantitativa de la implicación máxima.
- 3) Corteza frontal, temporal o parietal.
- 4) Recuento de placas relacionadas con la edad.

❖ Rangos: EA posible, probable o definitivo.

Ningún protocolo de diagnóstico individual es completamente satisfactorio, pero CERAD tiene los méritos de ser relativamente simple, aplicado exitosamente en un gran número de centros, reconocido ampliamente a nivel internacional y actualizado regularmente. Es el método de diagnóstico para la mayoría de los protocolos del estudio de la demencia (72).

Anexo 6. **KHATCHATURIAN (72)**

❖ Muestra de tejido:

- 1) 3 regiones de la neocorteza (frontal, temporal, parietal).
- 2) Hipocampo.
- 3) Amígdala.
- 4) Ganglio basal.
- 5) Sustancia negra.
- 6) Corteza cerebral.

7) Médula espinal.

❖ Técnicas histológicas:

- Coloración de plata de Bielschowsky, tioflavina S, rojo congo.

❖ Criterios de diagnóstico:

- En las tres regiones de la neocorteza, en campo de 200 X:
 - 1) Pacientes menores de 50 años: más de cinco PN y MNF por campo de 200 X.
 - 2) Pacientes de edad entre 50 y 65 años: ocho o más PN por campo de 200 X, con o sin MNF.
 - 3) Pacientes de edad entre 66 y 75 años: 10 o más PN por campo de 200 X, con o sin MNF.
 - 4) Pacientes mayores de 76 años: más de 15 PN por campo de 200 X, con o sin MNF.

El recuento de las lesiones se realiza en las zonas donde se registra mayor densidad de ellas (72).

Anexo 7. BRAAK y BRAAK (75)

❖ Muestra de tejido:

- 1) Hipocampo anterior.
- 2) Hipocampo posterior.
- 3) Occipital.

❖ Técnicas histológicas: secciones de 100µm con Gallyas.

❖ Criterios de separación en etapas: semicuantitativo (+/ +++) de MN y filamentos de neuropilo.

Braak y Braak describieron 6 estadios en la neuropatología de la EA (ver la figura de este anexo): Estadio-transentorrinal (I-II), Estadio límbico (III-IV) y Estadio isocortical (V-VI).

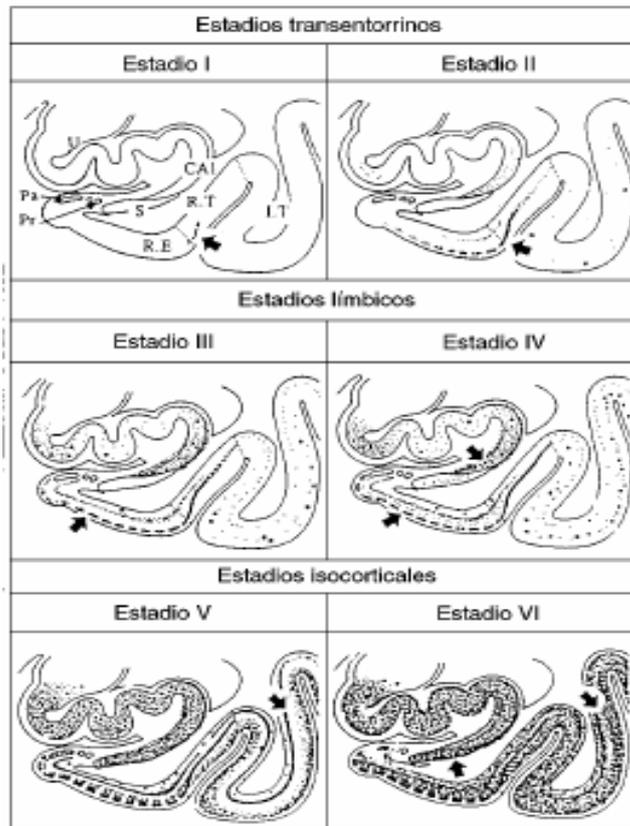
Durante el Estadio I (clínicamente silencioso), las primeras neuronas que manifiestan los cambios son las células de proyección específica de la región transentorrinal que se localizan en las profundidades del surco rinal.

En el estadio II se muestran numerosas MNF e hilos del neuropilo en la región transentorrinal, y algunos adicionales en la región entorrinal. La destrucción cortical en este estadio apenas impide la transmisión de la información neocortical (a través de la región entorrinal) a la formación hipocampal, pero sin exceder el umbral sobre el cual aparecen los síntomas clínicos iniciales.

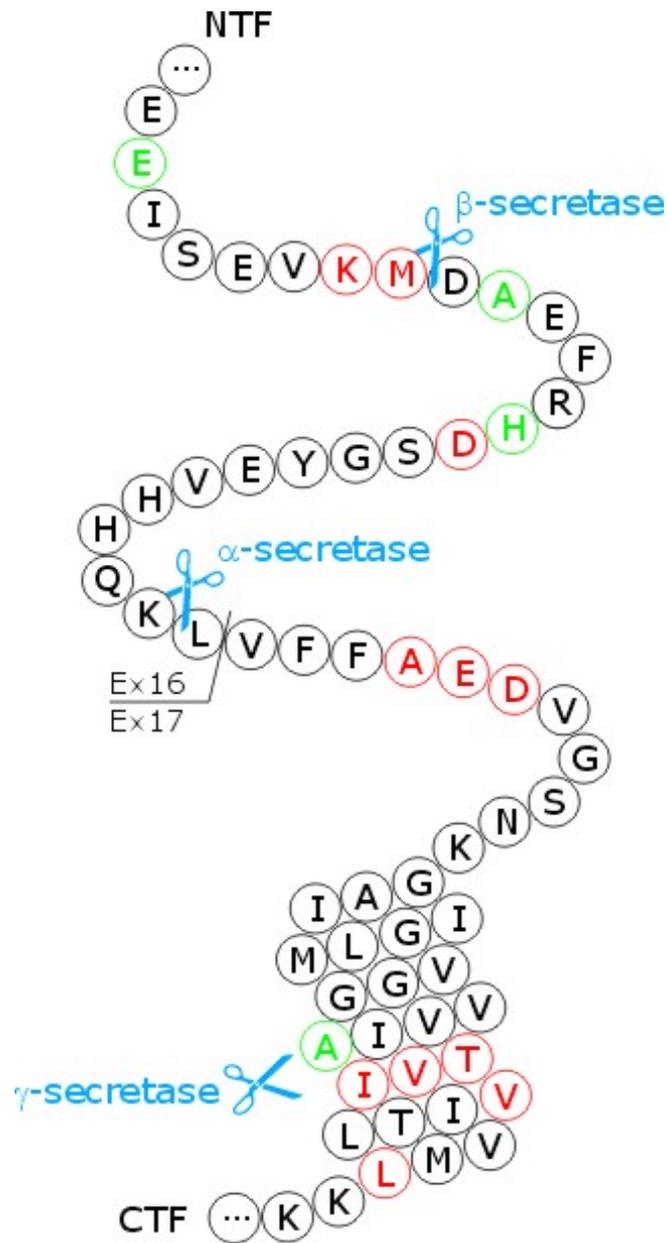
En los estadios límbicos III y IV, la destrucción cortical ya es severa, pero limitada a unas pocas regiones allocorticales y áreas adyacentes. La característica clave de estos estadios es la notable destrucción de las capas entorrinales responsables de la transmisión de datos desde la neocorteza hasta el hipocampo y viceversa. En el estadio III la formación hipocampal se ve afectada sólo ligeramente; sin embargo en el estadio IV el proceso de destrucción se difunde desde la región entorrinal hacia la amígdala, el hipocampo y especialmente hacia las áreas de asociación de la neocorteza temporal basal. Se registra un deterioro de las funciones cognitivas y presencia de cambios sutiles de la personalidad en los protocolos de correlación clínico-patológicos de muchos individuos en estos estadios, por lo que se considera a estas etapas como la EA incipiente.

Los estadios neocorticales finales (V-VI) muestran una gran cantidad de MNF e hilos de neuropilo en cada subdivisión de la corteza cerebral. Una característica propia del estadio V es la destrucción severa de las áreas asociativas neocorticales, dejando poco afectados a los campos motores primarios, las áreas sensoriales primarias y sus regiones circundantes.

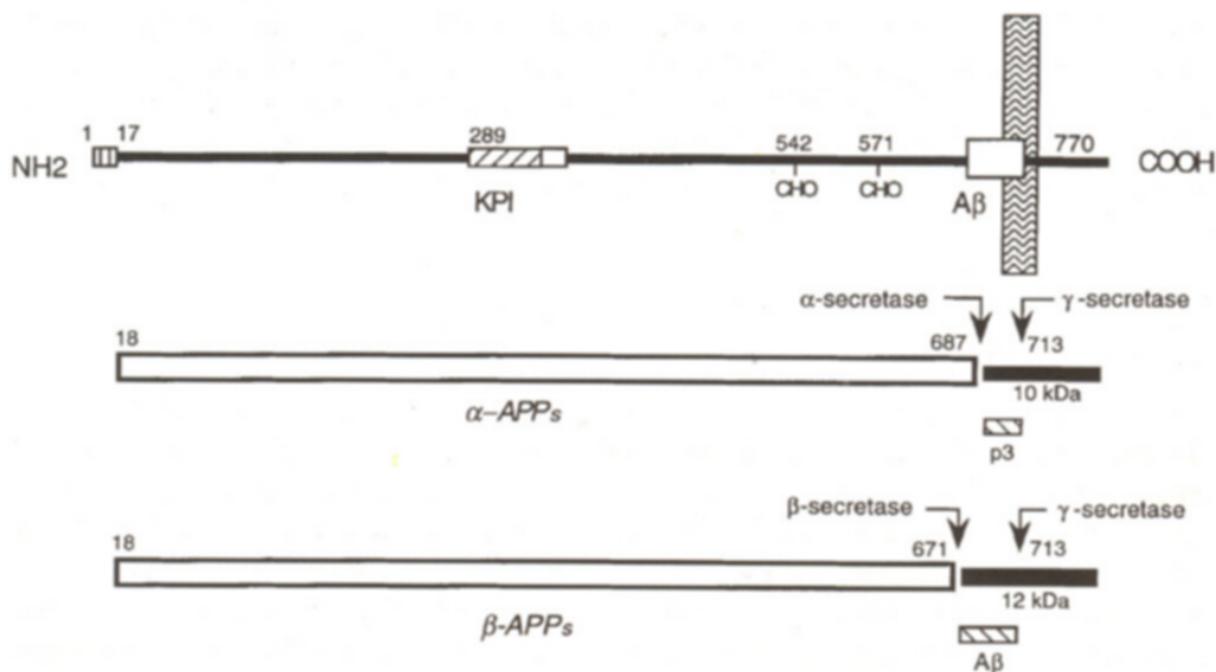
En el estadio VI el proceso patológico se extiende a las áreas primarias. Todos los individuos caracterizados en los estadios V y VI presentan una franca demencia. Estos estadios corresponden a la EA completamente desarrollada (43, 73, 75).



Anexo 8. Sitios con mutación (rojo) y polimorfismos (verde) dentro de la PPA



Agosto-2006

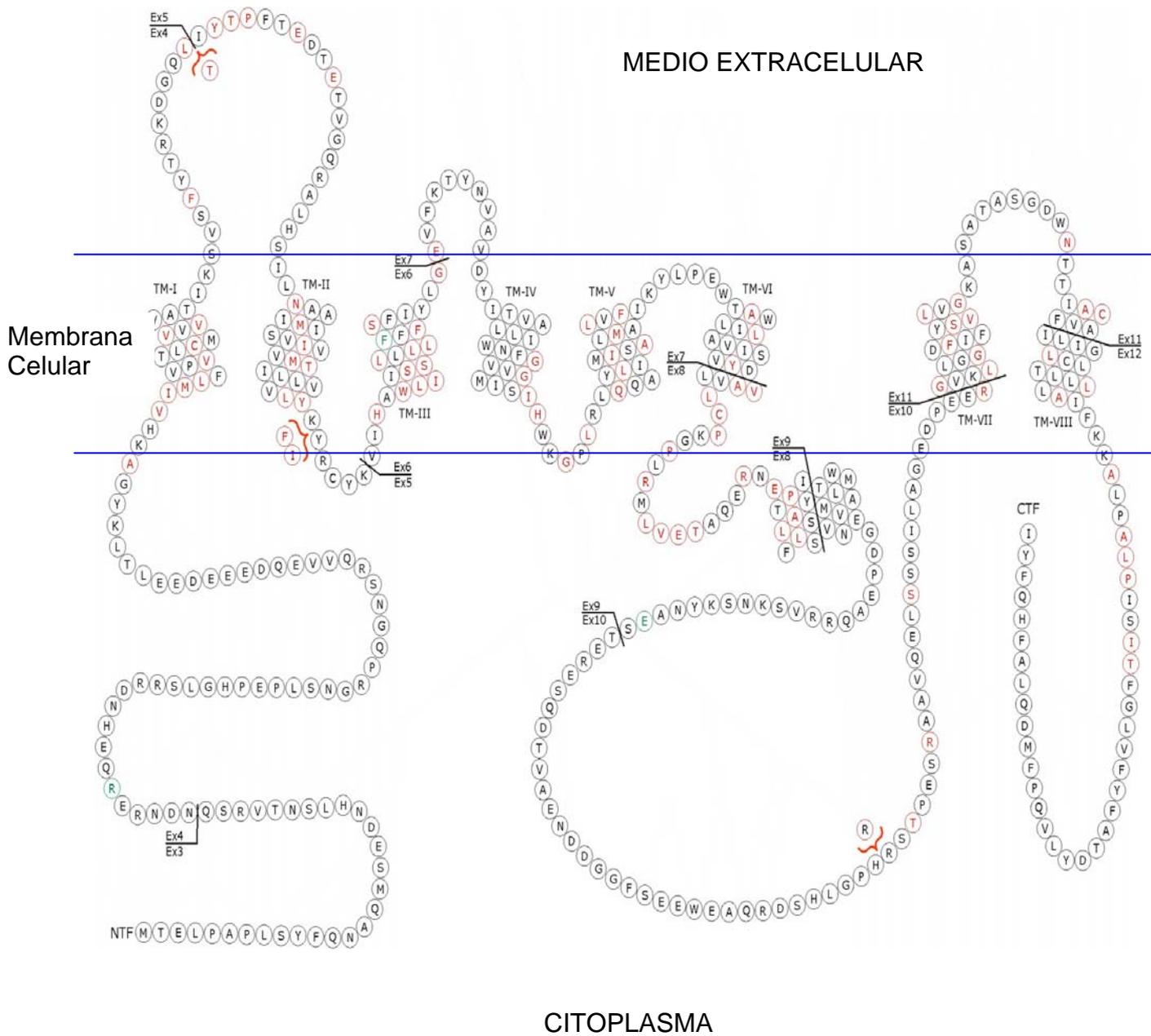


Diagramas esquemáticos de la proteína precursora de β-amiloide y sus principales derivados metabólicos. El diagrama superior describe el transcrito alternativo más grande conocido de *PPA*, comprendiendo 770 aminoácidos. Las regiones de interés están indicadas en sus posiciones correctas. Un residuo peptídico señal de 17 aminoácidos está en el extremo amino (caja con líneas verticales). Dos *splicing* alternativos de 56 y 19 aminoácidos están insertados en el residuo 289; el primero contiene al dominio inhibidor serin-proteasa tipo Kunitz (KPI). Dos sitios de N-glicosilación (CHO) son encontrados en los residuos 542 y 571. Un dominio único membranaral entre los aminoácidos 700-723 es indicado por la barra alta. El fragmento de la proteína β amiloide (Aβ) (caja blanca) incluye 28 residuos justo afuera de la membrana más los primeros 12-14 residuos del dominio transmembranaral. En el diagrama del medio, la flecha indica el sitio (después del residuo 687) de una escisión proteolítica constitutiva realizada por una proteasa (s) desconocida designada α-secretasa que es capaz secretar un ectodominio grande y soluble de PPA (α-PPAs) en el medio y la retención de un fragmento carboxi-terminal C83 (10kDa) en la membrana. El fragmento de 10kDa puede sufrir escisión por una proteasa (s) desconocida llamada γ-secretasa en los residuos 711 ó 713 para liberar el péptido p3. El diagrama inferior representa la escisión proteolítica alternativa después del residuo 671 por una enzima (s) desconocida llamada β-secretasa que resulta en la secreción de una molécula truncada de PPAs (β-PPAs) y la retención de un residuo carboxi terminal C99 (12kDa). El fragmento de 12kDa puede también sufrir una escisión por la γ-secretasa para liberar los péptidos Aβ.

Anexo 10. Sumario de actividades y funciones para la PPA

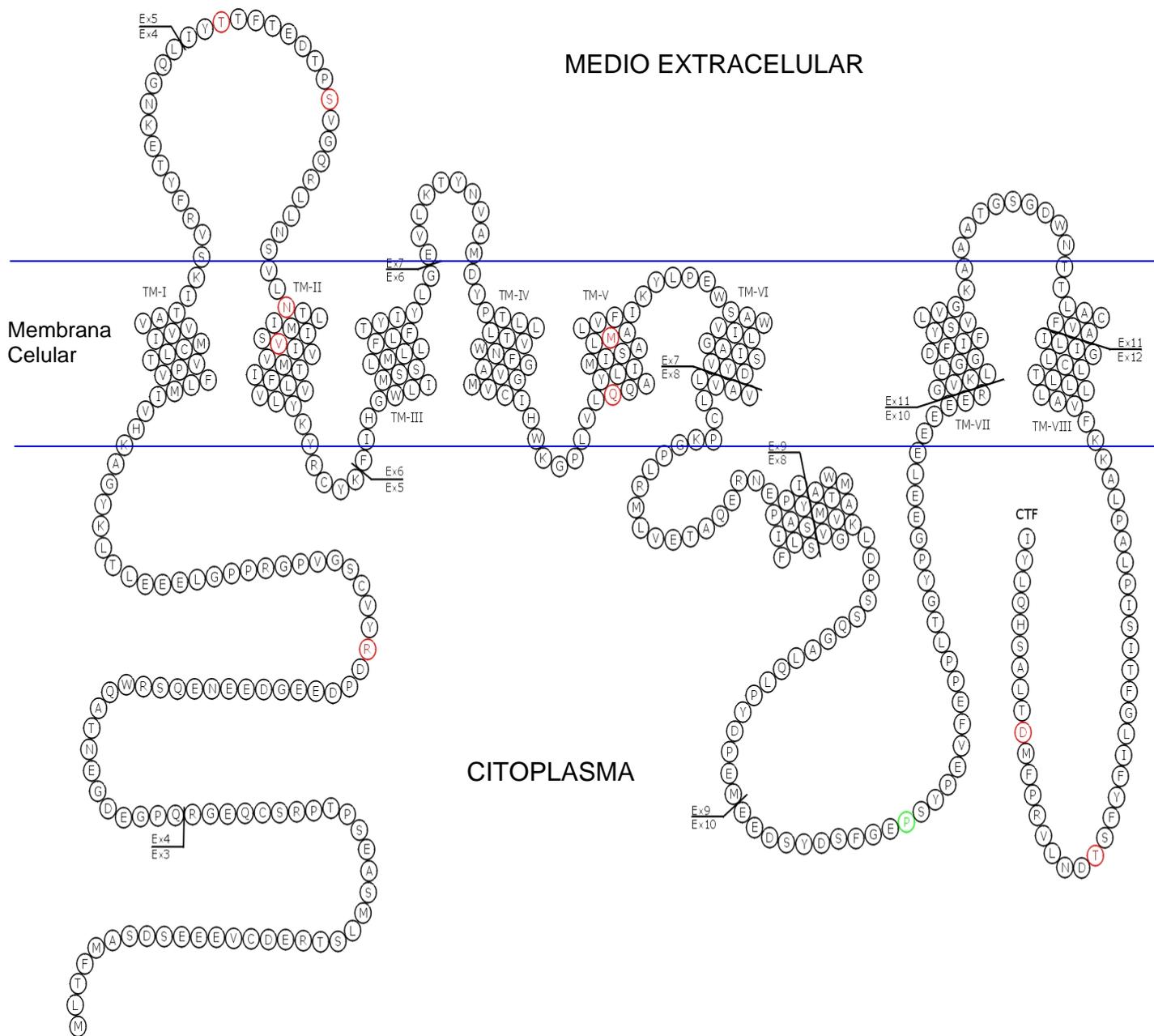
<i>Observed Activity</i>	<i>Proposed Function</i>	<i>Reference:</i>
Binding and reducing copper. Binding to zinc.	Metal ion homeostasis.	
Binding to HSPG, collagen, glypican and laminin. Stimulation of cell-extracellular matrix adhesion.	Regulation of neurite outgrowth. Mediator of cell-cell and cell-matrix interactions.	
Stimulation of neurite outgrowth and synaptogenesis.	Regulation of neurite outgrowth and/or synaptic plasticity.	
Stimulation of mitogenesis, MAP kinases and G _o proteins.	Regulation of cell proliferation, differentiation and survival.	
Regulation of calcium homeostasis, cGMP levels and K ⁺ channel activation. Protection against excitotoxicity, hypoglycemia and brain ischemia.	Neuroprotection.	
Serine protease inhibition.	Regulation of blood coagulation.	

Anexo 11. Sitios con mutación (rojo) y polimorfismos (verdes) dentro de la PSEN1



Agosto - 2006

Anexo 12. **Sitios con mutación (rojo) y polimorfismos (verdes) dentro de la PSEN2**



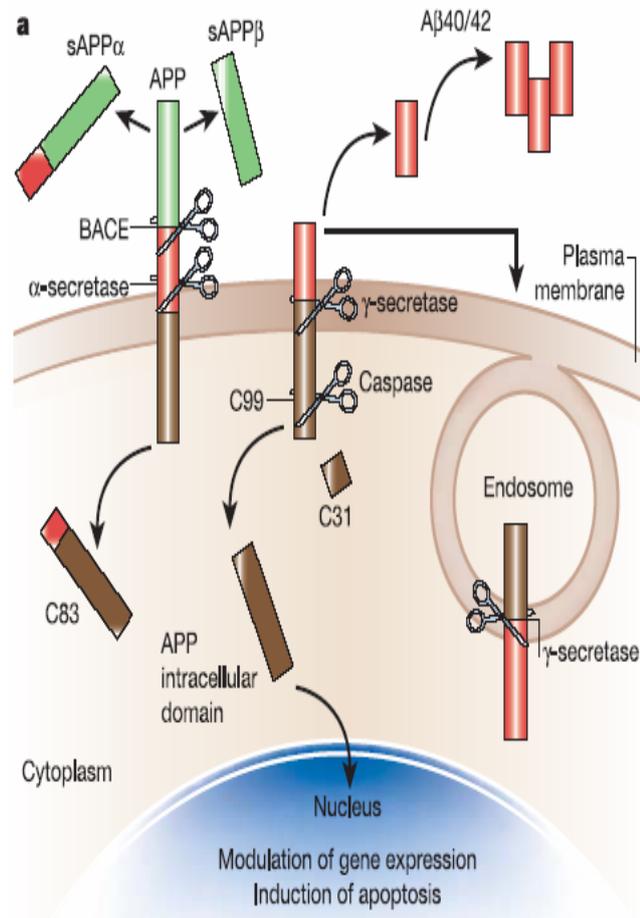
Agostol - 2006

Anexo 13. PROCESAMIENTO DE PPA Y NEURODEGENERACION

La PPA es expresada ampliamente en células de todo el cuerpo donde la cantidad producida esta influenciada por el estado de desarrollo y fisiológico de las células. La PPA es una proteína integral de la membrana con un dominio transmembranal,

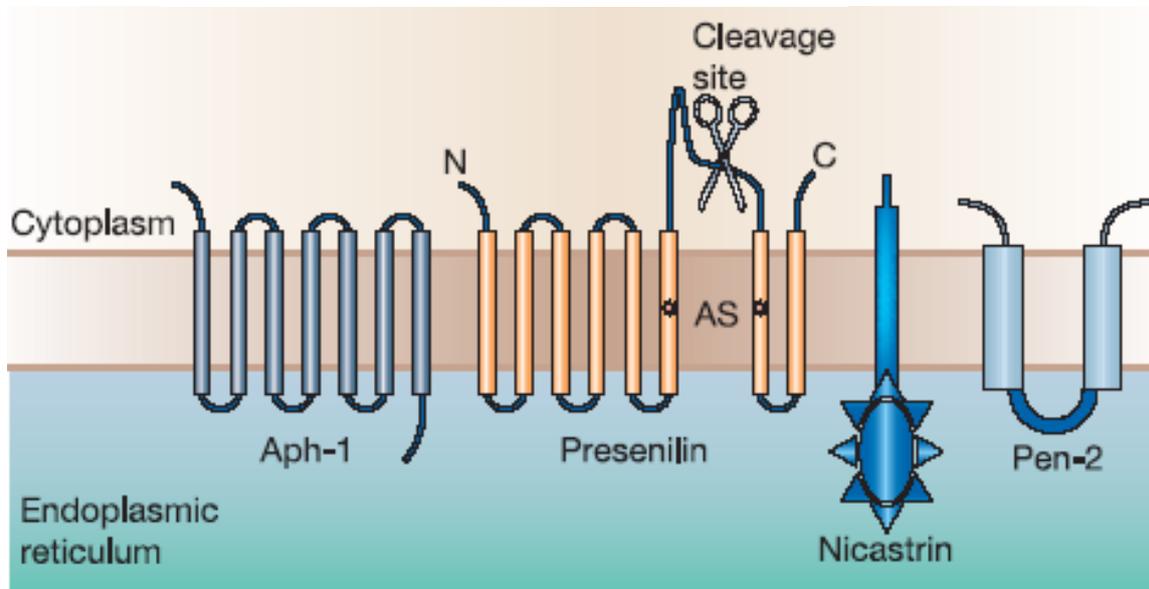
un dominio extracelular grande N-terminal glicosilado y un dominio C-terminal citoplasmático corto (117).

La forma más abundante cerebral (PPA-695) se produce principalmente en las neuronas, y difiere de las formas más largas en que carece de la secuencia KPI de su ectodominio. Las actividades enzimáticas involucradas en la escisión de PPA en la α , β y γ secretasas están siendo identificadas. La identidad de la α secretasa no es clara, aunque TACE y ADAM9 y ADAM10 son candidatos (117-118).



La escisión de PPA por la α secretasa libera PPA α (s) de la superficie de la célula y deja un fragmento PPA carboxi-terminal de 83 aminoácidos (C83). La producción de PPA α (s) incrementa en respuesta a la actividad eléctrica y activación de los receptores muscarínicos de acetilcolina, sugiriendo que la actividad neuronal incrementa la escisión α secretasa de PPA. El proceso amiloidogénico de la PPA involucra escisiones secuenciales por BACE y γ secretasa en el extremo N y C-terminal de A β , respectivamente. El fragmento C-terminal de 99 aminoácidos de PPA generado por BACE puede ser internalizado y además procesado por γ secretasa para producir A β 40/42 en los compartimientos endocíticos. La escisión de C99 por γ secretasa libera un dominio PPA intracelular que puede trasladarse al núcleo donde puede regular la expresión de genes, incluyendo la inducción de

genes apoptóticos. La escisión de PPA/C99 por las caspasas produce un péptido neurotóxico (C31) (117, 119).



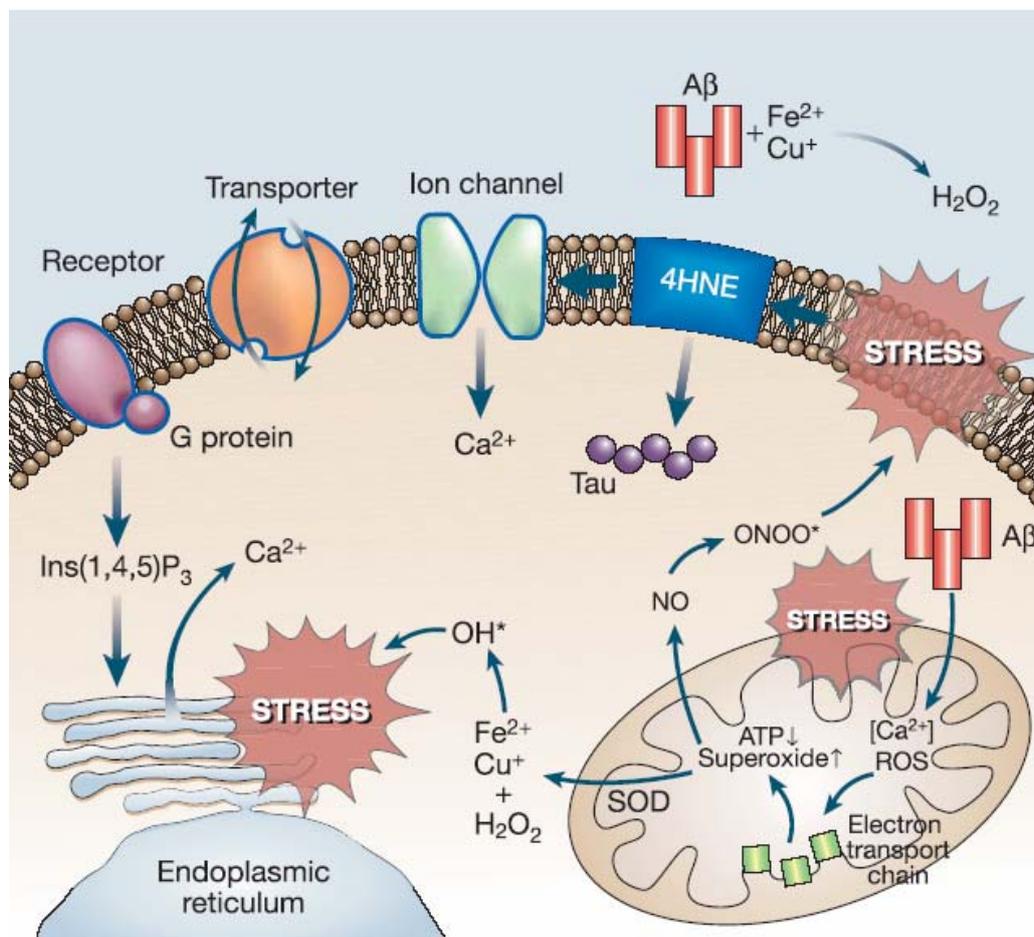
La γ secretasa, la cual escinde la PPA dentro de la región transmembranal, involucra cuatro proteínas diferentes: presenilina, nicastrina, Aph-1 y Pen-2 (117, 120-121).

Las funciones de la PPA no son totalmente entendidas, pero varias evidencias sugieren que tiene un papel importante en regular la supervivencia neuronal, crecimiento de las neuritas, plasticidad sináptica y adhesión celular. La PPA es transportada a lo largo de los axones hasta la terminal presináptica donde se acumula en altos niveles. Una posible función de la PPA total es como un receptor en la superficie celular que traduce señales dentro de la célula en respuesta a un ligando extracelular. Los papeles fisiológicos para PPA α (s) son apoyados por datos que muestran que éste es liberado de las terminales presinápticas en respuesta a la actividad eléctrica, y que PPA α (s) regula la excitabilidad neuronal, y potencia la plasticidad sináptica el aprendizaje y la memoria, posiblemente por activación de un receptor de la superficie celular que modula la actividad de los canales de potasio y también por activación del factor de transcripción NF- κ B (117, 122).

Algunos experimentos iniciales, mostraron que fragmentos sintéticos de A β pueden matar a las neuronas en cultivo dirigiendo a una serie de estudios que han revelado las bases químicas y biológicas de la disfunción sináptica y muerte

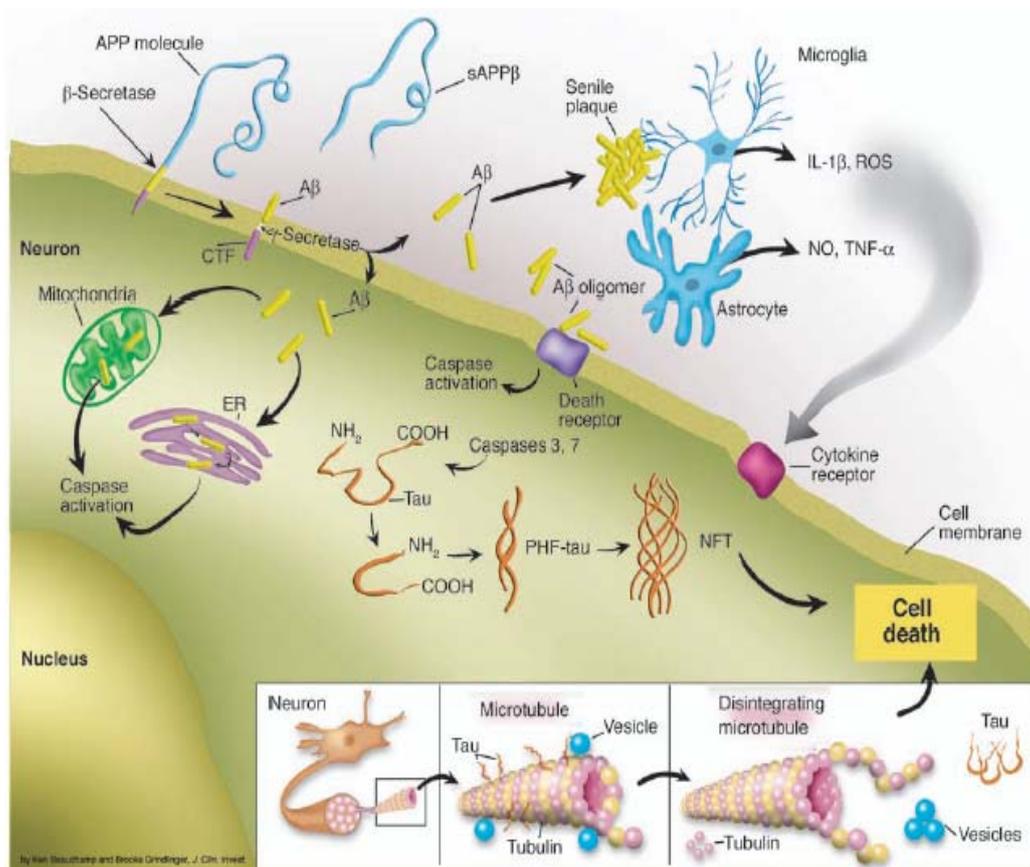
neuronal en la EA. El A β puede ser más tóxico cuando esta en la forma de oligómeros solubles en las etapas tempranas de agregación. La plasticidad de la sinapsis puede ser particularmente susceptible a los efectos adversos de la agregación A β por daño en el transporte de iones y glucosa, a su vez que se produce un daño neuronal por inducción del estrés oxidativo y disrupción de la homeostasis del calcio. Por otra parte, con el incremento de la producción de A β en la EA hay un decremento en la cantidad de PPA α (s), lo cual puede contribuir a la muerte de las neuronas por disminución de la resistencia de éstas a los insultos metabólicos y oxidativos (117, 123-124).

Anexo 14. Estrés oxidativo y alteraciones del calcio (125-131)

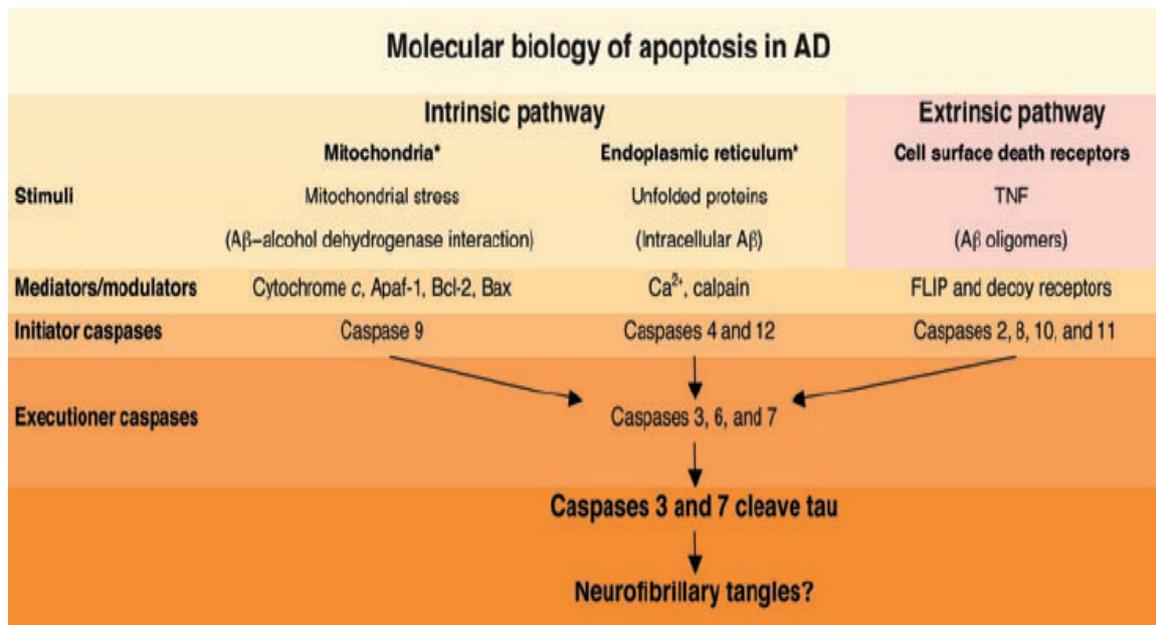


La acción neurotóxica de A β involucra la generación de ROS y disrupción de la homeostasis celular de calcio. Interacciones de los oligómeros A β y Fe o Cu genera H₂O₂. Cuando la agregación ocurre en la membrana celular, el estrés oxidativo asociado a la membrana resulta en la peroxidación de lípidos y la consecuente generación de 4HNE, un aldehído neurotóxico que modifica covalentemente las proteínas sobre los residuos cisterna, lisina e histidina. Algunas de las proteínas oxidativamente modificadas por el estrés oxidativo inducido por A β incluyen transportadores de membrana (ATPasas, transportador de glucosa y glutamato), receptores, proteínas de unión a GTP y canales iónicos. Las modificaciones oxidativas de tau por 4HNE y otras especies reactivas de oxígeno pueden promover su agregación y por lo tanto inducir la formación de MNF. A β también puede causar estrés oxidativo mitocondrial y desregulación de la homeostasis del calcio, resultando en daño de la cadena transportadora de electrones, incrementando la producción del anión superóxido y decremento en la formación de ATP. El superóxido es convertido a H₂O₂ por la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y el superóxido también puede interactuar con el óxido nítrico (NO) vía óxido nítrico sintasa (NOS) para producir peroxinitrito (ONOO^{*}). La interacción de H₂O₂ con Fe o Cu genera el radical hidroxilo (OH^{*}), un oxiradical altamente reactivo y potente inductor del estrés oxidativo asociado a membrana que contribuye a la disfunción del RE.

Anexo 15. MECANISMOS APOPTOTICOS EN LA DEGENERACION NEUROFIBRILLAR EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (132-134)



El proceso proteolítico contribuye a la hipótesis de la cascada amiloidea. A β es generado de PPA por coordinamiento de la proteólisis por β -secretasa, la cual genera fragmentos carboxi-terminales (CTFs) de PPA, y después por γ -secretasa. Las formas agregadas de A β en el compartimiento extracelular son las placas seniles. Los oligómeros A β extracelulares pueden activar las caspasas a través de la activación de los receptores de muerte de la superficie celular. Alternativamente, el A β intracelular puede activar a las caspasas a través de un proceso que involucra el estrés en RE o la mitocondria. Una de las consecuencias de la activación de las caspasas es la escisión de tau, la cual favorece cambios conformacionales característicos de los filamentos helicoidales apareados (PHF-tau). La acumulación progresiva de tau dirige a disrupción del citoesqueleto, falla del transporte axoplásmico y dendrítico, y subsecuente pérdida del apoyo trófico que culmina con la muerte neuronal. Los depósitos de amiloide extracelular en las placas seniles también disparan cambios gliales reactivos y neuroinflamación que pueden también contribuir a la pérdida neuronal a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), NO, y citocinas proinflamatorias tales como TNF- α y IL-1 β .



La interface de las dos moléculas mayores implicadas en la patogénesis de la EA con mecanismos moleculares de apoptosis. Las dos vías mayores para la apoptosis celular son la intrínseca y la extrínseca. La vía extrínseca involucra señalamientos a través de la superficie celular por medio de los receptores de muerte, tales como el receptor TNF. La unión de A β a estos receptores media la activación de las caspasas 2 y 8, promoviendo el proceso de apoptosis por la vía extrínseca. Alternativamente, el A β intracelular producido en el RE puede dirigir a estrés en este organelo, o la unión de A β a una alcohol-deshidrogenasa mitocondrial puede dirigir a estrés en este organelo. Ambas formas son parte de un mecanismo apoptótico por vía intrínseca. La activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 son capaces de escindir la proteína tau, la cual puede favorecer la formación de MNF. Los asteriscos indican los sitios posibles de acción de A β .

Anexo 16. HIPOTESIS AMILOIDEA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En adición a la clonación de *PSEN1* y *PSEN2* y, el descubrimiento que ellos alteran el metabolismo de la PPA a través de un efecto directo sobre la proteasa γ secretasa, ha habido cuatro observaciones importantes que apoyan fuertemente la hipótesis amiloidea. Primero, mutaciones en el gen que codifica la proteína tau

causa demencia frontotemporal con parkinsonismo. Esta enfermedad neurodegenerativa está caracterizada por un depósito severo de tau en las MNF en el cerebro, pero no hay depósito amiloideo. La implicación es que incluso con las consecuencias más severas de la alteración de tau (profunda formación de MNF que dirige a neurodegeneración fatal), no es suficiente para inducir las características placas seniles de la EA. Así, las MNF del tipo silvestre de tau vistas en los cerebros de EA son probablemente depositadas después de los cambios en el metabolismo del A β y la formación inicial de las PS. Segundo, la sobreexpresión en ratones transgénicos de la PPA y tau humanas mutantes sufren incremento en la formación de marañas tau positivas (comparado con la sobreexpresión de tau sola), mientras que la estructura y el número de sus placas amiloides no se alteran. Estos hallazgos sugieren que un procesamiento de PPA alterado ocurre antes que las alteraciones de tau en la cascada patogénica de la EA. Tercero, el cruzamiento de un ratón transgénico PPA con un ratón deficiente en ApoE reduce marcadamente el depósito cerebral de A β en los descendientes, dando una fuerte evidencia del papel patogénico del locus de ApoE en el metabolismo del A β . Y cuarto, una evidencia creciente indica que la variabilidad genética en el catabolismo y la “clarificación” del A β pueden contribuir al riesgo de la EA de comienzo tardío. Tomados juntos, esos cuatro hallazgos son consistentes con la noción que la acumulación cerebral de A β es la influencia primaria en la enfermedad, y que el resto de procesos, incluyendo la formación de MNF, resultan de un desbalance entre la producción y clarificación del beta amiloide (135-136).

Anexo 17. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F.; a _____ de _____ del 200__
Yo _____, otorgo mi consentimiento para que nos sean practicados los estudios genéticos considerados en el proyecto de investigación titulado “**Análisis Molecular del gen PSEN 1 en la Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano**”. Se me ha explicado que cuando esta enfermedad inicia antes de los 65 años es causada por una alteración molecular y que por medio de estudios de nuestro material genético se puedan conocer cuales fueron las alteraciones que originaron el padecimiento en la familia. Me informaron que el objetivo fundamental de este proyecto es caracterizar a nivel molecular las alteraciones presentes en familias afectadas con la enfermedad de Alzheimer. Se me ha explicado con detenimiento que nuestra participación consiste en que nos sean extraídos con jeringa 3 ml de sangre venosa, que no ocasionará molestias

mayores (riesgo menor al mínimo) y que solo pudiera presentarse la formación de un pequeño moretón en el área puncionada. Además se nos ha asegurado que la información obtenida en este estudio y relacionada con nuestro patrimonio genético no será divulgada ni usada para otros fines que no sea los establecidos en el proyecto de investigación mencionado. El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre los resultados del estudio, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee sobre dicho estudio o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en este servicio.

Nombre y Firma del Representante

Firma de Investigador principal
Dr. Carlos Venegas*

Testigo (1) Nombre y Firma

Firma de Investigador Asociado
Dra. Victoria Campos*

Testigo (2) Nombre y Firma

Firma de Investigador Asociado
Dr. Oscar Chacón C.*

*Dirección: Servicio de Genética. Hospital General de México
Teléfono: 27892000 Ext. 1278 y 1279

BIBLIOGRAFIA

1. Maurer K. et al. Auguste D. and Alzheimer's disease. *Lancet* 1997; 349: 1546-1549.
2. Terry R.D., Katzman R., Bick K., Sisodia S. *Alzheimer Disease*. Lippincott Williams and Williams. 2nd ed. United States of America 1999; I (1): 1-9.
3. Hardy J. et al. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosc.* 1997; 20: 154-159.
4. Sherrington R. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375: 754-760.
5. Levy-Lahad E. et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269: 973-977.
6. Pérez-Tur J. et al. La genética y la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol.* 2000; 30: 161-169.
7. Pericak-Vance M.A. et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 48: 1034-1050.
8. Bertram L., Tanzi R. Alzheimer's disease: one disorder, too many genes? *Hum. Mol. Genet.* 2004; Vol. 13: R 135 – R 141.
9. Wijsman E. M. et al. Evidence for a novel late-onset Alzheimer disease locus on chromosome 19p13.2. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 75: 398-409.
10. Blacker D. et al. Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Hum. Mol. Genet.* 2003; 12 (1): 23-32.
11. Terry R.D. et al. Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 1983; 14: 497-506.
12. Katzman R. et al. Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 1986; 314: 964-973.
13. Pearson R.C.A., Powel S. The neuroanatomy of Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 1989; 2: 101-122.
14. Novak M. et al. Neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Bratisl Lek Listy* 1997; 98 (6): 303-314.

15. Tomlinson B.E., Corsellis J. Ageing and dementias. Greenfields Neuropathology. New York, United States of America 1984; pág: 951-1025.
16. Mena R, Rivera H. La enfermedad de Alzheimer: una revisión. Rev. Bio. Med. 1993; 4: 205-217.
17. Lantos P. L. et al. The neuropathology of Alzheimer's disease. Dementia 1994; 186-196.
18. Zheng H. et al. β – amyloid precursor protein – deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. Cell 1995; 81: 525 – 531.
19. Spillantini M.G. et al. Topographical relationships between β – amyloid and tau protein epitopes in tangle bearing cells in Alzheimer disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990; 87: 3952-3956.
20. Cacabelos R. et al. Alzheimer's disease. Neuroimmune dysfunction and new forms of therapeutic intervention] Med Clin (Barc). 1994 Mar 26; 102(11):420-2.
21. Launer L.J. et al. Rates and risk factors for dementia and Alzheimer disease. Neurology 1999; 52: 78-84.
22. Barranco J.L. Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. Rev. Neurol. 2005; 40: 613-618.
23. Terry R.D., Katzman R., Bick K., Sisodia S. Alzheimer Disease. Lippincott Williams and Williams. 2nd ed. United States of America 1999; III (7): 95-116.
24. Hebert L.E. et al. Is the risk of developing AD greater for women than for men? Am. J. Epidemiol. 2001; 153: 132-136.
25. Barnes L. et al. Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. Arch. Gen. Psychiatry 2005; 62: 685-691.
26. Fleisher A. et al. Sex, apolipoprotein E e4 status, and hippocampal volumen in mild cognitive impairment. Arch. Neurol. 2005; 62: 953-957.
27. Etminan N. et al. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of AD.: systematic review and meta-analysis of observational studies. BMJ 2003; 327: 128-132.

28. In't Veld B.A. et al. Non steroidal antiinflammatory drugs and the risk of AD. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 1515-1521.
29. Guo Z. et al. Head injury and the risk of AD in the MIRAGE study. *Neurology* 2000; 54: 1316-1323.
30. Plassman B.L. et al. Documented head injury in early adulthood and risk of AD and other dementias. *Neurology* 2000; 55: 1158-1166.
31. Stern Y. et al. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer disease. *JAMA* 1994; 271: 1004-1010.
32. Engelhart M.J. et al. Dietary intake of antioxidants nutrients and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 2002; 287: 3223 – 3229.
33. Morris M.C. et al. Dietary intake of antioxidants nutrients and the risk of incident AD in biracial community study. *JAMA* 2002; 287: 3230-3237.
34. American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 1994.
35. Terry R.D., Katzman R., Bick K., Sisodia S. Alzheimer Disease. Lippincott Williams and Williams. 2nd ed. United States of America 1999; II (2): 15.
36. Heyman A. et al. Predictors of time to institutionalization of patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 48: 1304-1309.
37. Katzman R. et al. The malignancy of dementia: predictors of mortality in clinically diagnosed dementia in a population of Shanghai, China. *Arch. Neurol.* 1994; 51: 1220-1225.
38. Morris J.C. et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease (CERAD) IV. Rates of cognitive change in the longitudinal assessment for probable Alzheimer's disease. *Neurology* 1993; 43: 2457-2465.
39. Folstein M.F. et al. Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975; 12: 189-198.
40. Hughes CP et al. A new clinical scale for staging of dementia. *Brj.Psychiatry.* 1982.Jun;140: 566-572.

41. Mckhann G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer disease: report of the NICNCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; 34: 939-944.
42. Terry R.D., Katzman R., Bick K., Sisodia S. Alzheimer Disease. Lippincott Williams and Williams. 2nd ed. United States of America 1999; II (2): 14.
43. Terry R.D., Katzman R., Bick K., Sisodia S. Alzheimer Disease. Lippincott Williams and Williams. 2nd ed. United States of America 1999; V (13): 187-206.
44. Bondareff W. et al. Selective loss of neurons of origin of adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia. *Lancet* 1981; 1: 783-784.
45. Iversen L. et al. The toxicity in vitro of β amyloid protein. *Biochem J.* 1995; 311: 1-16.
46. Glenner G. et al. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1984; 120: 885-890.
47. Rosemuller J.M. et al. A β protein in Alzheimer's disease. Primary and secondary cellular events in extracellular amyloid deposition. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 1989; 48: 674-691.
48. Esch S. et al. Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1990; 248: 1122-1123.
49. Selkoe D. et al. Normal and abnormal biology of the amyloid precursor protein. *Ann. Rev. Neurosc.* 1994; 17: 489-517.
50. Kang J. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A β protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325: 733-736.
51. Citron M. et al. Mutation of the β amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* 1992; 360: 672-674.
52. Storey E. et al. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the A beta peptide. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1990; 25 (2); 81-97.
53. Busciglio J. et al. Neuronal localization of presenilin-1 and association with amyloid plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer disease. *Neurosc. J.* 1997; 17 (13): 5101-5107.

54. Riquiang Y. et al. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer disease β -secretase activity. *Nature* 1999; 402: 2533-2536.
55. Wolfe M. et al. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity. *Nature* 1999; 38: 513-517.
56. Jacobsen Helmut et al. The Influence of Endoproteolytic Processing of Familial Alzheimer's Disease Presenilin 2 on A β 42 Amyloid Peptide Formation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 35233 - 35239.
57. Strooper W. et al. A presenilin-1 dependent γ -secretase like protease mediates release of notch intracellular domain. *Nature* 1999; 398: 518-521.
58. Sinha S. et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein secretase from Human Brain. *Nature* 1999; 402 (2): 537-540.
59. Yue-Ming L. et al. Presenilin-1 is linked with secretase activity in the detergent solubilized state. *PNAS* 2000; 97: 6138-6143.
60. Vassar R. et al. A β generating enzymes: recent advances in β and γ secretase research. *Neuron* 2000; 27: 419-422.
61. Sauder M. et al. Modeling of substrate specificity of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein β secretase. *J. Mol. Biol.* 2000; 300; 241-248.
62. Bondareff W. et al. Molecular analysis of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease, an immunohistochemical study. *Am. J. Pathol* 1990; 137: 711-723.
63. Mukaetova-Ladinska E. et al. Biological determinants of cognitive changes in normal aging and dementia. *International Review of Psychiatric* 1995; 7: 399-417.
64. Goedert M. et al. Molecular dissection of the paired helical filament. *Neurobiol. Aging* 1995; 16(3): 325-34.
65. Goedert M. et al. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer disease. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1996; 777: 121-131.
66. Nunan J. et al. Regulation of APP cleavage by α , β , and γ secretases. *FEBS letters* 2000; 483: 6-10.

67. Pearson R.C. et al. The neuroanatomy of Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 1989; 2: 101-122.
68. López O. et al. Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer y del deterioro cognitivo leve. *Rev. Neurol.* 2003; 37 (2): 155-163.
69. Hamos J.E. et al. Synaptic loss in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology* 1989; 39: 355-361.
70. Samuel W. et al. Hippocampal connectivity and Alzheimer dementia: effects of synapse loss and tangle frequency in a two component model. *Nuerology* 1994; 44: 2081-2088.
71. Vekrellis K. et al. Bax promotes neuronal cell death and is down regulate during the development of the nervous system. *Development* 1997; 124: 1239-1249.
72. Morris C. et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1989; 39: 1159-1165.
73. Mirra S.S. et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991; 41: 479-486.
74. Guimera A. et al. Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Esp. Patol.* 2002; 35 (1): 21-48.
75. Braak H. et al. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; 82: 239-259.
76. Terry R.D., Katzman R., Bick K., Sisodia S. Alzheimer Disease. Lippincott Williams and Williams. 2nd ed. United States of America 1999; VI (20): 311.
77. Bird T.D. Alzheimer disease overview. *Gene reviews* 2003; 1-11.
78. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>.
79. St George-Hyslop P. et al. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 1987; 235: 885-890.
80. Tanzy R.E. et al. Amyloid b protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 1987; 235: 880-884.

81. Kitaguchi N. et al. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid proteins show protease activity. *Nature* 1988; 331: 530-532.
82. Citron M. et al. Inhibition of amyloid b-protein production in neuronal cells by the serine protease inhibitor. *Neuron* 1996; 17: 171-179.
83. Haas C. *Molecular Biology of Alzheimer's Disease: genes and mechanisms involved in amyloid generation*. Harwood Academic Published, Amsterdam, The Netherlands 1998; C (5): 95-109.
84. Terry R.D., Katzman R., Bick K., Sisodia S. *Alzheimer Disease*. Lippincott Williams. 2nd ed. United States of America 1999; VI (19): 293-310.
85. St. George-Hyslop P. et al. Genetic Linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder. *Nature* 1990; 347: 194-7.
86. Chartier-Harlin M.C. et al. Early onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 1991; 353: 844-846.
87. Goate A. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349: 704-706.
88. Rogaev E.I. et al. Familial Alzheimer's disease in kindred's with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995; 376: 775-778.
89. Citron M. et al. Evidence that the 42 and 40 amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 13170-13175.
90. Hutton M. et al. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 6 (10): 1639-1646.
91. Pérez-Tur J. Presenilinas en la génesis de la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol.* 2001; 33 (10): 967-972.
92. Cruts M. et al. Molecular genetics análisis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum. Mol. Genet* 1995; 12: 2363-2371.
93. Thinakaran G. et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 1996; 17: 181-90.

94. Kim T.W. et al. The presenilin genes and their role in early onset familial Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 11006-11010.
95. Haass C. *Molecular Biology of Alzheimer's Disease: genes and mechanisms involved in amyloid generation.* Harwood Academic Publisher. Amsterdam, The Netherlands 1998; D (10): 193-206.
96. Cook D.G. et al. Expression and analysis of presenilin 1 in a human neural system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 9223-9228.
97. Walter J. et al. Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin 1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 5349-5354.
98. De Strooper B. et al. Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 3590-3598.
99. Dewji N. et al. Cell surface expression of the Alzheimer disease related presenilin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 9926-9931.
100. Haass C. *Molecular Biology of Alzheimer's Disease: genes and mechanisms involved in amyloid generation.* Harwood Academic Publisher. Amsterdam, The Netherlands 1998; D (11): 207-217.
101. Levy-Lahad E. et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269: 973-977.
102. Vito P. et al. Requirement of the familial Alzheimer's disease genes PS-2 for apoptosis. Opposing effect of ALG3. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 31025-31028.
103. Wolozin B. et al. Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 1996; 274: 1710-1713.
104. Passer B. et al. Interaction of Alzheimer's disease presenilin-1 and presenilin 2 with Bcl X(L). A potential role in modulating the threshold of cell death. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 24007-24013.
105. Alberici A. et al. Presenilin 1 protein directly interacts with Bcl2. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 30764-30769.

106. Herreman A. et al. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 11872-11877.
107. De Strooper B. et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998; 391: 387-390.
108. Wolfe M.S. et al. Two transmembrane aspartate in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 1999; 398: 513-517.
109. Kimberly W.T. et al. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 3173-3178.
110. De Strooper B. et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999; 398: 518-522.
111. Li Y.M. et al. Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* 2000; 405: 689-694.
112. Seiffert label presenilin 1 and 2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 34086-36091.
113. Leissring M.A. et al. Calsenilin reverses presenilin-mediated enhancement of calcium signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 8590-8595.
114. Pack-Chuny E. et al. Presenilin 2 interacts with sorcin, a modulator of the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 14440-14445.
115. Duff K. et al. Increased amyloid-b42 (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 1996; 383: 710-713.
116. Tomita T. et al. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German Families) increases the secretion of amyloid b protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 2025-2030.
117. Mattson M.P. Pathways towards and away from Alzheimer disease. *Nature* 2004; 430: 631-639.

118. Baxbaum J.D. et al. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 27765-27767.
119. Leissring M.A. et al. A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 4697-4702.
120. Yu G. et al. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp1 signal transduction and beta APP processing. *Nature* 2000; 407: 48-54.
121. Takasugi N. et al. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 2003; 422: 438-441.
122. Kimberly W.T. et al. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 40288-40292.
123. Lambert M.P. et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 6448-6453.
124. Kaye R. et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003; 300: 486-489.
125. Vitek M.P. et al. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 4766-4770.
126. Good P.F. et al. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 1996; 149: 21-28.
127. Smith M.A. et al. Oxidative damage in Alzheimer's disease. *Nature* 1996; 382: 120-121.
128. Sano M. et al. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 1216-1222.
129. Cotrell D.A. et al. Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD. *Neurology* 2001; 57: 260-264.
130. Huang X. et al. Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; 1012: 153-163.

- 131 . Zhu X. et al. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2004; 1000: 32-39.
132. Golde T.E. Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 11-18.
133. Gong Y. et al. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggest a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 10417-10422.
134. Dickson D. Apoptotic mechanism in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause o effect? *J. Clin. Invest.* 2004; 114: 23-27.
135. 154. Hardy J. et al. The amyloid hypotesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-356.
- 136 . Tanzi R.E. et al. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypotesis: a genetic perspective. *Cell* 2005; 120: 545-555.
- 137 . Bertram L. et al. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 1449-1457.
138. Haass C. et al. The Presenilins in Alzheimer's Disease-Proteolysis Holds the Key. *Science* 1999; 286: 916-919.
139. Schek D. et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400: 173-177.
140. De Mattos R.B. Peripheral anti-A β antybody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 8850-8855.
141. Frenkel D. et al. Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glutiramer acetate clears β amyloid in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 2423-2433.
142. Solomon B. Generation of anti- β -amyloid antibodies via phage display technology towards Alzheimer's disease vaccination. *Vaccine* 2005; 23: 2327-2330.
143. Weggen S. et el. A subset NSAIDs coger amyloidogenic A(beta) 42 inde pendently of cyclooxygenase activity. *Nature* 2001; 414: 212-214.

144. Jick H. et al. Statins and risk of dementia. *Lancet* 2000; 356: 1627-1631.
145. Wolozin B. et al. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 2000; 57: 1439-1443.
146. Fassbender K. et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo.
147. Buffone G.G. et al. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin. Chem.* 1985; 31: 164-165.
148. Sambrook J. et al. *Molecular cloning 2a edición.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
149. Kamimura K. et al. Familial Alzheimer's disease genes in Japanese. *J. Neurobiol. Sci.* 1998; 160: 76-81.
150. Nussbaum L. et al. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *NEJM.* 2003; 348: 1356-1364.
151. Iqbal K., Sisodia S., Winblad B. *Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics.* John Wiley and Son. New York, United States of America 2001; I (2): 3-10.
152. Bowen J. et al. Progression to dementia in patients with isolated memory loss. *Lancet* 1997; 349: 763-765.
153. Snowdon D.A. et al. Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life: findings from the Nun Study. *JAMA* 1996; 275: 528-532.
154. Petersen R.C. et al. Memory function in very early Alzheimer's disease. *Neurology* 1994; 44: 867-872.
155. Fazekas F. et al. Pathology correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology* 1993; 43: 1683-1689.
156. Gilman S. Imaging the brain-first of two parts. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 812-820.
157. Johnson K. et al. Preclinical prediction of Alzheimer's disease using SPECT. *Neurology* 1998; 50: 1563-1571.

158. Terry R.D., Katzman R., Bick K., Sisodia S. Alzheimer Disease. Lippincott Williams and Williams. 2nd ed. United States of America 1999; II (6): 67-93.
159. Carnero C. Revisión sistemática de la utilidad de la tomografía por emisión de positrones en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Rev. Neurol. 2003; 37: 860-870.
160. Jagust W. Molecular Neuroimaging in Alzheimer's disease. NeuroRx 2004; 1 (2): 206-212.
161. Blennow K. et al. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. NeuroRx 2004; 1(2): 213-225.
162. Iqbal K., Sisodia S., Winblad B. Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics. John Wiley and Son. New York, United States of America 2001; III (25): 275-283.
163. Gon Lee H. et al. Challenging the Amyloid Cascade Hypothesis. Senile Plaques and Amyloid- β as Protective Adaptations to Alzheimer Disease. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2004; 1019: 1-4.
164. Haass C. Molecular Biology of Alzheimer's Disease: genes and mechanisms involved in amyloid generation. Harwood Academic Publisher. Amsterdam, The Netherlands 1998; E (16): 291-305.
165. Terry R.D., Katzman R., Bick K., Sisodia S. Alzheimer Disease. Lippincott Williams and Williams. 2nd ed. United States of America 1999; VI (22): 339-346.
166. Iwata N. et al. Identification of the major Abeta 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: supression leads to biochemical and pathological deposition. Nat. Med. 2000; 6(2): 143-150.
167. Eckmann E.A. et al. Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. J. Biol. Chem. 2001; 276: 24540-24548.
168. Hu J. et al. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta peptide (A beta); retards A beta aggregament, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. J. Biol. Chem. 2001; 276: 47863-47868.
169. Edbauer D. et al. Insulin-degrading enzyme rapidly removes the β -amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). J. Biol. Chem. 2002; 277 (16); 13389-13393.

170. Kinoshita A. et al. The intracellular domain of the low density lipoprotein receptor-related protein modulates transactivation mediated by amyloid precursor protein and Fe 65. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (42): 41182-41188.
171. Bocroni B. et al. Intronic CYP46 polymorphism along with ApoE genotype in sporadic Alzheimer disease: from risk factors to disease modulators. *Neurobiol. Aging.* 2004; 25: 747-751.
172. Yonhhong Li. Et al. Association of late onset Alzheimer's disease with genetic variation in multiple members of the GAPD gene family. *PNAS* 2004; 101 (44): 15688-15693.
173. Blomquist E. et al. Sequence variants of IDE are associated with the extent of β -amyloid deposition in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging* 2005; 26: 795-802.
174. Guidi I. et al. Influence of the Glu298Asp polymorphism of NOS3 on age at onset and homocystein levels in AD patients. *Neurobiol. Aging* 2005; 26: 789-794.
175. Kölsch H. et al. ACE I/D polymorphism is a risk factor of Alzheimer's disease but not of vascular dementia. *Neurosc. Lett.* 2005; 377: 37-39.
176. Bird T. Early onset Familial Alzheimer disease. *Genereviews.*2005;2:1-22.
177. Robert L. et al. Thompson and Thompson Genetic in Medicine. Saunders; 6a ed. 2001.
178. Lee C. et al. Genome-wide análisis of single-nucleotide polymorphism in human expressed sequences. *Nature* 2000; 26: 233-236.
179. Lee C. et al. Effient discovery of single-nucleotide polymorphism in coding regions of human genes. *The Pharmacogenomics Journal* 2002; 2: 236-242
180. Crust M. et al. Estimation of the genetics contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Hum.Mol.Genet.* 1998; (7):43-51.
181. Campion D. et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 664-670.

182. Kowalska A et al. Molecular genetics of Alzheimer disease: presenilin-1 gene analysis in a cohort of patients from the Poznań region. *J. Appl. Genet.* 2003; 44 (2): 231-234.
183. Janssen JC. Et al. Early onset familial Alzheimer disease. Mutation frequency in 31 families. *Neurology* 2003; 60: 235-239.
184. Lambert J.C. et al. The 48C/T polymorphism in the presenilin-1 promoter is associated with an increased risk of developing Alzheimer disease and an increased A β load in brain. *J. Med. Genet.* 2001; 38: 353-355.
185. Theuns J. et al. Promoter mutations that increase Amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am. J. Hum Genet.* 2006; 78: 936-946.
186. De Jonghe C. et al. Aberrant splicing in the presenilina-1 intron4 mutation causes prseniline Alzheimerps disease by increased A β 42 secretion. *Hum Mol. Genet.* 1999; 8 (8): 1529-1540.
187. Janssen J.C. et al. Alzheimer's disease due to an intronic presenilin-1 (PSEN-1 intron 4) mutation. *Brain* 2000; 123 (5): 894-907.